

◆ 实验研究论著 ◆

黄龙通络汤对大鼠坐骨神经损伤的修复作用 及对神经生长因子表达的影响

郑雨中, 刘思景, 黎勇, 郑臣校

广州中医药大学附属中山中医院骨二科, 广东 中山 528403

[摘要] 目的: 探讨黄龙通络汤对 SD 大鼠坐骨神经损伤的修复作用以及对神经生长因子表达的影响。方法: 选取 SD 大鼠 90 只, 随机分为 3 组, 每组 30 只, 建立右侧坐骨神经损伤模型, 术后分别用黄龙通络汤、生理盐水及甲钴胺混悬液灌胃, 给药后进行大体观察与坐骨神经功能指数 (SFI)、神经电生理学、小腿三头肌湿重 (WWT) 的测定, 免疫组化染色观察神经生长因子的表达。结果: 黄龙通络汤组的 SFI、神经传导速度恢复率、复合肌肉诱发电位振幅恢复率及 WWT 恢复率均优于生理盐水组和甲钴胺组 ($P < 0.05$); 甲钴胺组以上各项指标均优于生理盐水组 ($P < 0.05$)。黄龙通络汤组、甲钴胺组神经生长因子蛋白的表达均多于生理盐水组 ($P < 0.05$), 黄龙通络汤组与甲钴胺组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。结论: 黄龙通络汤能促进大鼠坐骨神经损伤的修复。

[关键词] 坐骨神经损伤; 黄龙通络汤; 坐骨神经功能指数 (SFI); 神经电生理学; 小腿三头肌湿重 (WWT); 神经生长因子

[中图分类号] R745.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 04-0262-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.04.125

周围神经损伤的研究在骨科领域一直是研究的热点, 也是研究的难点。中医药治疗周围神经损伤历史悠久, 有着丰富的经验和深厚的理论, 并有整体和局部双重兼顾的特点, 符合神经损伤修复的综合过程。多年来, 本院经验用方黄龙通络汤应用于周围神经损伤患者的治疗取得良好的临床效果^[1], 但其作用机制缺乏实验依据, 本研究探讨黄龙通络汤对 SD 大鼠坐骨神经损伤后的修复作用, 以期为该方的临床应用提供实验依据, 阐明其作用机制。

1 材料

1.1 实验材料 SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只 (广州中医药大学实验动物中心提供), 体质量 200 ~ 230 g。实验在本院中药药理实验室完成。

1.2 黄龙通络汤 组成: 黄芪 30 g, 地龙、当归各 20 g, 赤芍、鸡血藤、党参各 15 g, 川芎 10 g, 由本院中药房提供并常规煎煮浓缩至生药量 2 g/mL, 汤药准备好后保存在冰箱中备用。生理盐水 (四川科伦药业股份公司), 甲钴胺片 (苏州卫材)。

2 实验方法

2.1 造模 实验动物用 3% 戊巴比妥钠 2 mg/kg 腹腔注射麻

醉^[2], 采用坐骨神经钳夹手术^[3]致右下肢成瘫软状态模型, 神经电生理检查无动作电位出现, 说明神经干被钳断, 造模成功。

2.2 分组与药物干预 将造模成功的 90 只 SD 大鼠随机分成 3 组各 30 只, 分别为黄龙通络汤组、生理盐水组及甲钴胺组。造模后 3 天, 黄龙通络汤组用黄龙通络汤液按 1 mL/100 g 灌胃, 生理盐水组用生理盐水按 1 mL/100 g 灌胃, 甲钴胺组用甲钴胺和生理盐水制成的 0.05 mg/mL 混悬液, 按 1 mL/100 g 灌胃。3 组用药均每天 1 次, 连续 4 周。

3 实验指标与统计学方法

3.1 大体观察 包括饮食、步态、精神状态、局部感染情况及死亡情况。

3.2 坐骨神经功能指数 (SFI) 于术后 2 周、4 周进行, 3 组各取 15 只大鼠, 根据文献^[4]的方法测定以下 3 个变量: 足印长度: 足印的最长距离。足印宽度: 第 1 趾至第 5 趾连线的距离, 每次选用最长距离。中间足趾宽度的距离: 第 2 趾至第 4 趾宽度连线的距离, 每次选用最长距离。将各数据带入 Bain 公式计算各组大鼠的 SFI。

3.3 神经电生理学 于术后 4 周进行, 3 组各取 15 只大鼠, 用 3% 戊巴比妥钠 2 mg/kg 腹腔注射麻醉, 暴露右后肢坐骨神

[收稿日期] 2014-12-10

[基金项目] 中山市第二批科技计划项目 (20132A187)

[作者简介] 郑雨中 (1980-), 男, 主治医师, 主要从事创伤骨科、手外科临床与研究。

经,游离坐骨神经,使用肌电图仪进行神经传导速度恢复率(伤侧/健侧×100%)及复合肌肉诱发动作电位振幅恢复率(伤侧/健侧×100%)的检测^[6]。

3.4 小腿三头肌湿重(WWT) 于术后2周、4周进行,3组各取15只大鼠,首先切除双侧小腿三头肌,放入电子天平称重,然后以损伤侧小腿WWT除以对侧WWT乘以100%计算恢复率。

3.5 神经生长因子的表达 于术后2周、4周进行,3组各取15只大鼠,取紧邻损伤部位远端坐骨神经于10mm内神经组织,固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,根据试剂盒步骤进行免疫组化染色。每根神经远近端染2张切片,用Olym pus显微镜观察,Leica显微摄影仪摄取放大400倍的图像,采用Leica公司Qwin v3 Standard软件进行分析,分别计数5个单位视野内的阳性细胞数。

3.6 统计学方法 数据采用单因素方差分析和t检验统计分析。

4 实验结果

4.1 大体观察 所有大鼠饮食正常。术后3组大鼠右侧后肢均跛行,踝下垂,趾屈曲,精神状态良好,切口均无感染,无大鼠死亡。

4.2 3组治疗2周、4周SFI比较 见表1。治疗2周时,3组SFI比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗4周时,黄龙通络汤组SFI优于生理盐水组、甲钴胺组($P<0.05$),甲钴胺组SFI优于生理盐水组($P<0.05$)。

表1 3组治疗2周、4周SFI比较($\bar{x}\pm s$) mm

组别	n	2周	4周
黄龙通络汤组	15	-62.5±12.6	-18.5±6.3
生理盐水组	15	-65.8±11.3	-29.5±7.4
甲钴胺组	15	-60.2±17.1	-26.7±6.5

与生理盐水组同期比较,① $P<0.05$;与甲钴胺组同期比较,② $P<0.05$

4.3 3组神经传导速度恢复率与复合肌肉诱发动作电位振幅恢复率比较 见表2。治疗4周时,3组两两比较,黄龙通络汤组神经传导速度恢复率、复合肌肉诱发动作电位振幅恢复率均优于生理盐水组、甲钴胺组($P<0.05$),甲钴胺组2项指标均优于生理盐水组($P<0.05$)。

表2 3组神经传导速度恢复率与复合肌肉

诱发动作电位振幅恢复率比较($\bar{x}\pm s$) %

组别	n	神经传导速度恢复率	复合肌肉诱发动作电位振幅恢复率
黄龙通络汤组	15	69.02±16.68	64.39±14.28
生理盐水组	15	50.09±13.01	31.29±8.03
甲钴胺组	15	56.18±16.89	45.18±11.29

与生理盐水组比较,① $P<0.05$;与甲钴胺组比较,② $P<0.05$

4.4 3组治疗2周、4周WWT恢复率比较 见表3。治疗2周时,3组WWT比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗4周后,黄龙通络汤组WWT恢复率高于生理盐水组、甲钴胺组($P<0.05$),甲钴胺组恢复率高于生理盐水组($P<0.05$)。

表3 3组治疗2周、4周WWT恢复率比较($\bar{x}\pm s$) %

组别	n	2周	4周
黄龙通络汤组	15	54.12±1.45	78.89±6.55
生理盐水组	15	52.67±2.87	57.34±9.67
甲钴胺组	15	53.99±2.17	65.83±7.93

与生理盐水组同期比较,① $P<0.05$;与甲钴胺组同期比较,② $P<0.05$

4.5 3组治疗2周、4周单位视野NGF阳性细胞数比较 见表4。治疗2周时,3组阳性细胞数比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗4周后,黄龙通络汤组、甲钴胺组阳性细胞数均多于生理盐水组($P<0.05$),黄龙通络汤组与甲钴胺组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表4 3组治疗2周、4周单位视野NGF阳性细胞数比较($\bar{x}\pm s$) 个/HP

组别	n	2周	4周
黄龙通络汤组	15	15.56±3.73	36.11±8.12
生理盐水组	15	16.01±5.94	2.05±6.12
甲钴胺组	15	14.68±4.39	33.36±5.52

与生理盐水组同期比较,① $P<0.05$

5 讨论

本院骨二科经验用方黄龙通络汤中,黄芪为君药,大剂量使用,取其大补元气,气旺以促血行,祛瘀而不伤正,并助诸药之力;现代药理学研究表明^[6],黄芪等中药提取液对雪旺氏细胞的生长有明显促进作用,而雪旺氏细胞对神经再生起着很重要的作用,故黄芪对神经修复再生能起肯定的作用。地龙具有清热止痉、通经活络之效,配伍益气行血药常用于治疗气虚血瘀、经络不利之偏瘫失语者,且其咸寒通降,可制黄芪升阳助火之热;现代药理学研究表明,地龙具有溶栓及抗凝作用,且能有效清除自由基,抗脂质过氧化^[7]。黄芪、地龙2味药物对恢复神经功能有显著功效^[8]。当归活血补血,并有提高全身代谢的作用,为臣药。川芎、赤芍助当归活血祛瘀,鸡血藤助当归养血活血、舒经通络,党参助黄芪补脾益气,均为佐使药。诸药合用,共奏补气活血通络之功。

本研究结果显示,黄龙通络汤组的SFI与神经传导速度、复合肌肉诱发电位振幅、WWT的恢复情况均优于生理盐水组和甲钴胺组($P<0.05$);甲钴胺组以上各项指标均优于生理盐水组($P<0.05$)。黄龙通络汤组、甲钴胺组神经生长因子蛋白的表达均多于生理盐水组($P<0.05$),黄龙通络汤组与甲钴胺组比较无统计学差异($P>0.05$)。提示黄龙通络汤能促进大鼠坐骨神经损伤的修复,值得进一步研究和临床推广应用。

[参考文献]

- [1] 李绪松, 郑臣校, 苏永康. 黄龙通络汤内服治疗周围神经损伤的临床研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(19): 2061-2062.
- [2] 张栋. 不同麻醉药对大鼠麻醉效果的比较[J]. 实验动物科学, 2007, 24(1): 19-20.
- [3] 石杜鹃, 凌丽, 薛金伟. 补阳还五汤药浴对大鼠周围神经损伤再生影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1066-1067.
- [4] 沈宁江, 朱家恺. 坐骨神经功能指数在神经功能评价中的应用[J]. 中华显微外科杂志, 1993, 16(4): 284-287.
- [5] 张馨元, 刘技辉, 崔勇, 等. 周围神经损伤的电生理检测及其法医学意义[J]. 法医学杂志, 2008, 24(4): 280-283.
- [6] 姜保国, 蒋岩. 复方红芪提取液对许旺氏细胞分化的影响[J]. 中华显微外科杂志, 2002, 25(1): 38-40.
- [7] 殷出梅, 储益平, 吴鹏. 地龙活性提取物的主要药效学试验[J]. 中草药, 2002, 33(10): 926-928.
- [8] 王先敏, 纪宁. 补阳还五汤的现代研究及临床应用概况[J]. 新疆中医药, 2001, 19(3): 80-82.

(责任编辑: 刘淑婷, 吴凌)

何首乌中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的分离纯化与抗癌活性研究

刘商

江山市中医院, 浙江 江山 324100

[摘要] 目的: 建立对何首乌中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷分离纯化的方法, 以及研究其抗癌活性。方法: 何首乌中药材粉末先经乙醇回流提取、氯仿回流提取、乙酸乙酯回流提取后, 再经 D101 大孔吸附树脂柱, 70% MeOH 洗脱, 得到化合物 I, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 确定该化合物的结构。采用 MTT 比色法抗癌活性筛选试验对化合物 I 作抗苯并芘等致癌活性的筛选。结果: 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 谱图分析, 确定化合物 I 为大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷, 该化合物对苯并芘致癌具有抑制活性。结论: 该分离纯化方法准确、可靠; 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷抗癌活性的证实, 对其药理活性研究具有重要意义。

[关键词] 何首乌; 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷; 分离; 纯化; 抗癌活性

[中图分类号] R284.1 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 04-0264-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.04.126

何首乌是一味有名的传统中药, 现代药理研究表明, 何首乌具有益智、抗衰老、调节机体免疫功能、抗炎镇痛、降血脂、预防心脑血管疾病、护肝等功效, 另外, 还具有抗肿瘤作用^[1-2]。大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷是何首乌中重要的活性羟基蒽醌类化合物之一。一直以来, 对于该化合物, 学者们围绕其益智等活性做了大量工作, 但对其抗癌活性的研究尚未见报道。介于目前对何首乌中的大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷分离纯化和抗癌活性研究的情况尚欠深入。因此, 笔者以何首乌中药材粉末作为研究对象, 先经乙醇回流提取、氯仿回流提取、乙酸乙酯回流提取后, 再经 D 101 大孔吸附树脂柱, 70% MeOH 洗脱, 得到化合物 I, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 确定该化合物的结构。现详细报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器 RE-5299 型旋转蒸发器(上海况胜实业发展有限公司); XFB-200 型粉碎机(吉首市中诚制药机械有限公司)。

1.2 材料与试剂 何首乌(中国药材公司), 鉴定为蓼科植物何首乌的干燥的块根; D 101 大孔吸附树脂柱(上海开平树脂有限公司); 1, 6-二硝基苯并芘、3, 9-二硝基蒽(从苏州德和佳化工有限公司购买); 苯并芘(从上海倍卓生物科技有限公司购买); 氯仿、乙酸乙酯、乙醇等均为国产分析纯级; 甲醇为国产色谱纯级。

2 方法和结果

2.1 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的分离纯化 粉碎何首乌, 过 20 目筛, 称取粉末 500 g, 加 75% 乙醇回流提取 5 次, 滤

[收稿日期] 2014-12-02

[作者简介] 刘商 (1977-), 女, 主管中药师, 研究方向: 中药的临床应用。