

## 实验研究

## 宽叶缬草治疗兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的实验研究

湖北鄖阳医学院附属太和医院(十堰 442000) 罗国君 席刚明 范华燕

武汉大学医学院(441000) 余绍祖

**提 要** 目的:探讨宽叶缬草(VOL)对蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛的作用,并与尼莫通(Nim)进行对照。方法:采用枕大池二次注血法复制兔 SAH 模型,用 VOL500mg·kg<sup>-1</sup>及 Nim6mg·kg<sup>-1</sup>每 8h 1 次,口服给药,治疗 5d 后用组织化学方法分别显示兔 SAH 基底动脉及海马 CA<sub>1</sub> 区微血管,用 CMIAS 图像分析系统及体视学方法对基底动脉管径和微血管密度进行定量分析,并观察海马 CA<sub>1</sub> 区组织病理学变化,评价 VOL 对 SAH 后脑血管痉挛的作用。结果:SAH 后 5d 基底动脉管径明显缩小,海马 CA<sub>1</sub> 区微血管长度密度、体积密度明显下降,海马 CA<sub>1</sub> 区神经元变性坏死,VOL 治疗后基底动脉管径、微血管密度恢复正常,神经元少有坏死,与 SAH 组比较有显著性差异,其作用大小与 Nim 相比差异不显著。结论:VOL 能扩张脑基底动脉,改善微循环,保护神经元,是值得进一步研究开发的中草药。

**关键词** 宽叶缬草 蛛网膜下腔出血 脑血管痉挛 微血管形态计量学 实验研究

宽叶缬草 (*Valeriana officinalis* var. *latifolia* Miq, VOL) 是败酱科缬草属的变种,广泛分布于华中、西南等地,可以作为缬草的代用品,其根及根茎入药有驱风、镇静、安神等作用,其化学成份主要有缬草三酯、挥发油、黄酮等。<sup>[1]</sup>缬草制剂在美国的用量居各种中药用量的第 4 位,而在我国其开发利用尚处于初级阶段,主要原因是对其药理作用和疗效未能深入研究。<sup>[2]</sup>近年来研究表明 VOL 具有解除平滑肌痉挛、扩张冠状动脉,调脂及抗动脉粥样硬化等作用,<sup>[3,4]</sup>可望成为抗心律失常新药;<sup>[2]</sup>对脑血管有作用,目前研究较少。本研究通过建立兔蛛网膜下腔出血(SAH)模型,以钙拮抗剂尼莫通(Nimotop, Nim)作为阳性对照组,观察 VOL 对基底动脉痉挛及微循环障碍的作用,以期对 VOL 的进一步开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 VOL 根采自湖北省神农架林

区,并经生药鉴定,生药浸泡 30min,蒸馏、过滤,再加适量蒸馏水配制成浓度为 500mg/ml 的溶液,分装灭菌后 4℃ 贮存备用。Nim20mg/片,德国拜耳公司制药、杭州默沙东制药公司分装(批号 100799),二胺基联苯胺(美国 Sigma),半导体冰冻切片(山西),Olympus 全自动显微摄影仪(日本),CMIAS 图像分析系统(德国),照片微尺及单网格测试系统(日本),其它试剂由市场上购得。

1.2 实验动物分组及模型 日本大耳白兔 30 只,体重 2.5~3.5kg,雌雄不拘,由武汉大学医学院实验动物中心提供,饲料为标准合成饲料,自由饮用自来水。动物分 5 组:正常组、假手术组、SAH 组、Nim 治疗组、VOL 治疗组。模型制作:采用枕大池二次注血法。<sup>[5]</sup>首次及注血后第 48h 分别注入 0.5ml/kg 的自体非肝素化动脉血。假手术组注入 0.5ml/kg 37.0℃ 无菌生理盐水。

1.3 给药方法 在第 1 次注血后 1h 给药, VOL

名以准确的内涵,揭示了饮酒不当所造成人体的损伤、损害的本质属性;其外延包含了饮酒致伤的所有疾病。以“酒伤”命名反映了该病全过程的规律及特点,突出了根本性矛盾,有病因可查,病机可究,规律可循,治法可依,预后可测,完全符合中医学疾病命名原则。通过学习与研究,笔者认为酒伤属于中医学

中饮伤的范畴。引饮不当(过饮、久饮、劣饮、偏饮、乱饮)对人体的损伤谓之饮伤。同样地,我们把过量、长期饮酒或饮用劣质酒等由饮酒不当所造成的损伤谓之酒伤,实质上涵盖了现代医学有关酒精性肝病各种类型及因饮酒不当而造成的多系统的疾病。

(收稿日期:2002-01-27)

500ml/kg/次, Nim 6mg/kg/次, 灌胃给药, 每 8h 给药 1 次; SAH 组给予等体积生理盐水, 连续治疗 5d, 于末次灌胃 8h 后取材制作标本。

### 1.4 检测指标及方法

1.4.1 基底动脉管径、壁厚比、腔面积测量 断头处死兔后, 取三叉神经根连续向上 2mm 段为取材点, 置于 4% 多聚甲醛、0.5% 戊二醛缓冲液 (PH7.2~7.4) 4℃ 浸泡固定 48h 后, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续石蜡切片, 片厚 6μm, H·E 染色, 用 CMIAS 图像分析系统测定。

1.4.2 脑微血管形态测量 沿兔脑中线矢状切开大脑半球, 自窦汇处向上 2mm, 冠状切下整个背侧海马的脑片放入上述固定液, 固定 24h, 用冰冻切片连续切片, 片厚 80μm, 每只兔取 5 张片, 行内源性过氧化物酶染色, 常规脱水、封片, 在 Olympus 显微镜下, 观察并拍摄海马 CA<sub>1</sub> 区的锥体细胞层血管; 血管直径 (D) 用照片微尺测定, 微血管长度 (Lv) 用单网格测试系统测定, 按 Bell-Ball 法<sup>[7]</sup>测定微血管体积密度 (Vv)。

1.4.3 海马 CA<sub>1</sub> 区神经元观察 右侧大脑半球固定后, 蔗糖梯度脱水, 冰冻连续切片, 片厚 6μm, 用 CVTMT 混合尼氏染色, 对海马 CA<sub>1</sub> 区进行光镜观察, 并用 CMIAS 图像分析系统计算神经元密度 (正常神经元数/CA<sub>1</sub> 区总长度)。

1.4.4 统计学处理 表中数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 sdat 统计软件统计分析, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

## 2 结果

2.1 VOL 对基底动脉管径和形态的影响 见表 1。

SAH 后在光镜下基底动脉明显收缩, 管壁增厚, 内弹力膜多皱折, 并有断裂、分布不均匀等情况, Nim 及 VOL 治疗后管径增大, 与正常组、假手术组比较有显著意义 ( $P>0.05$ )。

2.2 VOL 对兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区微血管形态学的影响 见表 2。

海马 CA<sub>1</sub> 区 SAH 后 Lv、Vv 与正常组、假手术组比较有明显的下降 ( $P<0.01$ ), Nim 及 VOL 治疗后微血管密度增加, 而微血管直径变化不明显。见图 1~4。

2.3 海马 CA<sub>1</sub> 区神经元光镜检查 正常组海马 CA<sub>1</sub> 区神经元排列整齐、规则, 神经元核大而圆, 核仁清晰, 胞浆着色淡 (图 5); SAH 组海马 CA<sub>1</sub> 区神经元数量明显减少, 残存神经元可见固缩及噬神经细胞现象 (图 6); Nim 及 VOL 治疗后, 海马 CA<sub>1</sub> 区神经元基本上排列整齐、规则, 可见局部细胞呈缺血性改变, 少有神经元固缩, 见图 7、图 8。定量观察海马 CA<sub>1</sub> 区神经元密度见表 3。

表 1 Nim VOL 治疗后对 SAH 基底动脉管径、面积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	切片张数	直径 (mm)	腔面积 (mm <sup>2</sup> )	壁厚比 (%)
正常组	30	509.29±49.17	0.2060±0.024	21.92±4.18
假手术组	30	498.15±35.30	0.1958±0.028	22.64±3.96
SAH 组	30	365.33±47.36 <sup>1)</sup>	0.1068±0.037 <sup>1)</sup>	29.0±2.53 <sup>1)</sup>
Nim 组	30	479.24±48.20 <sup>2)</sup>	0.1844±0.031 <sup>2)</sup>	24.10±2.75 <sup>2)</sup>
VOL 组	30	469.75±34.60 <sup>2)3)</sup>	0.1802±0.029 <sup>2)3)</sup>	24.05±4.37 <sup>2)3)</sup>

注: 1) 与正常组、假手术组、Nim 组、VOL 组比较,

$P<0.01$ ;

2) 与 SAH 组比较,  $P<0.01$ ;

3) 与 Nim 组、正常组、假手术组比较,  $P>0.05$ 。

表 2 VOL 对兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区微血管形态学的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	切片张数	D (mm)	Lv (mm·mm <sup>-3</sup> )	Vv
正常组	30	4.98±0.83	448.28±48.25	0.047±0.015
假手术组	30	4.84±0.77	446.91±57.76	0.044±0.012
SAH 组	30	4.72±0.95 <sup>4)</sup>	371.98±62.40 <sup>1)</sup>	0.037±0.016 <sup>1)</sup>
Nim 组	30	4.86±0.64	465.33±49.70 <sup>2)</sup>	0.049±0.015 <sup>2)</sup>
VOL 组	30	4.79±0.52	457.20±54.36 <sup>2)3)</sup>	0.45±0.02 <sup>2)3)</sup>

注: 1) 与正常组、假手术组、Nim 组、VOL 组比较,

$P<0.01$ ;

2) 与 SAH 组比较,  $P<0.01$ ;

3) 与 Nim 组、正常组、假手术组比较,  $P<0.01$ ;

4) 与正常组、假手术组、Nim 组、VOL 组比较,  $P>0.05$ 。

表 3 海马 CA<sub>1</sub> 区神经元密度 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	切片张数	神经元密度 (个/mm)
正常组	30	191.70±19.82
假手术组	30	189.91±10.16
SAH 组	30	86.35±10.06 <sup>1)</sup>
Nim 组	30	181.40±8.62 <sup>2)</sup>
VOL 组	30	174.84±11.44 <sup>2)3)</sup>

注: 1) 与正常组、假手术组、Nim 组、VOL 组比较,

$P<0.01$ ;

2) 与 SAH 组比较,  $P<0.01$ ;

3) 与 Nim 组比较,  $P>0.05$ 。

## 3 讨论

SAH 后脑血管痉挛 (CVS) 一直是神经内外科重点科研课题, SAH 后不仅可以引起颅底大血管的痉挛, 而且还可导致脑灌注压的降低及微循环异常, 是引起急性或迟发性脑缺血的主要原因,<sup>[8]</sup> 其发生机制相当复杂, 可能与氧合血红蛋白、钙超载、内皮素、自由基及脂质过氧化物, 血小板及其它活性物质有关。<sup>[9]</sup> 上述各种因素有些互为因果、相互影响, 目前倾向认为 SAH 后 CVS 的发生是多种因素综合作用的结果, 其中血管内皮细胞产生的具有调节血管张力的血管活性物质, 尤其是内皮源性缩血管物质增多是引起 CVS 的主要原因。

尼莫通是一种选择性作用于颅内血管的钙拮抗

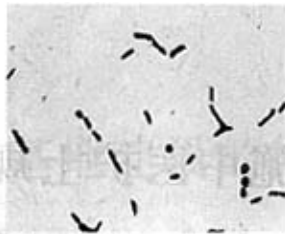
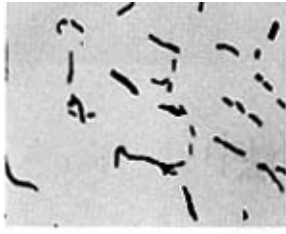


图 1 正常兔海马 CA<sub>1</sub> 区微血管密度 (DAB - Niel 染色, ×400) 片厚 80μm, 冠状切片

图 2 兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区微血管密度 (DAB - Niel 染色, ×400) 片厚 80μm, 冠状切片

图 3 ND 治疗兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区微血管密度 (DAB - Niel 染色, ×400) 片厚 80μm, 冠状切片

图 4 VOL 治疗兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区微血管密度 (DAB - Niel 染色, ×400) 片厚 80μm, 冠状切片

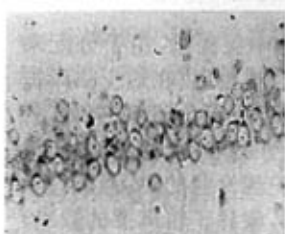
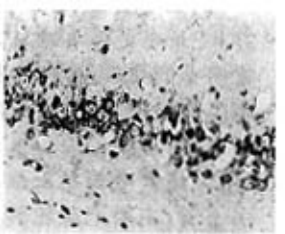
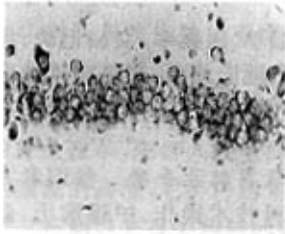


图 5 正常兔海马 CA<sub>1</sub> 区细胞形态 (Nissle 染色, ×400)

图 6 兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区细胞形态 (Nissle 染色, ×400)

图 7 ND 治疗兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区细胞形态 (Nissle 染色, ×400)

图 8 VOL 治疗兔 SAH 后海马 CA<sub>1</sub> 区细胞形态 (Nissle 染色, ×400)

剂,逆转血管痉挛,改善脑血流,扩张脑内小动脉并有减轻血管内皮细胞的炎性反应,保护血管内皮细胞,改善微循环,<sup>[10]</sup>广泛应用于 SAH 后 CVS 的治疗,能明显降低致残率和死亡率。本实验结果也表明 Nim 具有上述作用。VOL 目前研究尚处于初级阶段,既往研究表明有扩张心血管的作用,近期研究表明 VOL 可以对抗兔动脉粥样硬化的内皮细胞损伤,抑制平滑肌细胞的增殖,具有抗氧化作用。<sup>[4]</sup>尹虹等<sup>[11]</sup>认为 VOL 能促进 PGI<sub>2</sub> 的分泌,抑制 TXA<sub>2</sub> 的产生,从而舒张冠状动脉,并能减少肿瘤坏死因子 (TNF-a) 产生,改善冠脉微循环,而 VOL 对于脑血管有无作用尚未见报道。由于 SAH 后 CVS 的病理变化与动脉粥样硬化、高血压的血管病理变化相一致。内皮细胞的损伤所致内皮依赖性舒张能力下降是 CVS 的始动因素,氧自由基的释放引起膜脂质过氧化导致的膜通透性改变和钙离子超载,在 SAH 后 CVS 的发展中起重要作用;因此用保护内皮细胞的药物及抑制氧自由基的生成,有利于预防或减轻 CVS。<sup>[10]</sup>从本实验来看 VOL 可以扩张基底动脉,从而改善脑血液循环,减轻神经元坏死,其作用与 Nim 相近,其机制可能与上述讨论有关。本文资料提示 VOL 可以应用于脑血管病的防治,有必要对 VOL 进行深入的研究,为 VOL 的进一步开发利用提供详实的理论依据。

4 参考文献

1 赵宁训,黄泰康,丁志遵,等. 中药辞海(第 3 卷). 北京:中国医药科技出版社,1997:1550

2 邓君,谈锋. 缬草的研究进展. 国外医药·植物药分册 2000;(2):53

3 任世兰,于龙顺,裴宁. 缬草对平滑肌和心血管的药理研究. 中草药 1982;13(3):23

4 胡昌兴,杨桂元,李庆山,等. 宽叶缬草对高血脂症家兔动脉硬化化的影响. 国际心血管病杂志 2000;2(3):56

5 Endo S, Branson PJ, AllKsne JF. Expenimental model of symptomatic vasospam in Rabbits. Stroke 1988; 19: 1420

6 熊正文,李青光,李自强,等. 内源性过氧化物酶法显示微血管及判断血液循环方法的建立与应用. 中国组织化学与细胞化学杂志 1993;2(3):146

7 Bell MA, Ball MJ. Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in aging and demented people; Diameters and Densities. Acta Neuropathot(Bell) 1981;53(4):299

8 Enblad P, Valtysson J, Andersson J, et al. Simultaneously intracerebral microdialysis and positron emisson tomography in the detection of ischemic in patients with subarachnoid hemorrhage. J Cereb Blood Flow 1996; 16 (4):637

9 Cook DA. Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. Pharmac. Ther 1995;66:259

10 Feigin VL, Rinkel GJE, Algra A, etal. Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A systematic review. Neurology 1998;50:876

11 尹虹,薛存宽,叶建明,等. 缬草提取物抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究. 微循环学杂志 2000;10(1):12

(收稿日期:2001-12-11)