

# 异亚丙基莽草酸对大鼠中动脉栓塞大鼠脑含水量和能量代谢的影响

王宏涛, 孙建宁, 徐秋萍\*, 郭亚健

(北京中医药大学中药学院药理学教研室, 北京 100102)

**摘要:** 目的 探究异亚丙基莽草酸(ISA)减轻脑缺血损伤是否与改善能量代谢与减轻脑水肿有关。方法 采用三氯化铁致大鼠中动脉栓塞模型, 观察药物对脑组织含水量, 能荷及  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的影响。结果 ISA  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可降低模型大鼠脑组织含水量, 减轻脑水肿程度; ISA  $200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可明显增加模型大鼠脑组织能荷值; ISA  $200, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  对模型大鼠脑组织  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力均有明显的提高作用。结论 ISA 可能通过保护脑组织能量代谢和提高脑组织  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力, 减轻脑水肿程度, 保护缺血性损伤的脑组织。

**关键词:** 莽草酸; 血栓形成; 脑动脉; 脑缺血; 能量代谢; 腺苷三磷酸酶, 钠, 钾

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)04-0270-03

异亚丙基莽草酸(3,4-oxo-isopropylidene shikimic acid, ISA)是中药木兰科植物八角茴香中提取的有效成分莽草酸的衍生物。本室最早发现莽草酸(shikimic acid)有抗血栓和减轻局灶性脑缺血损伤的作用<sup>[1,2]</sup>, 但由于其极性大, 口服不易吸收, 又合成其衍生物 ISA。ISA 极性小且水溶性较好, 结构稳定, 很利于药学研究, 初步试验证明对局灶性脑缺血有一定的保护作用<sup>[3]</sup>。本实验研究 ISA 对大鼠中动脉栓塞后脑组织含水量, 能荷值,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响及可能的作用机理。

收稿日期: 2002-01-07 接受日期: 2002-03-07

基金项目: 国家中医药管理局“十五”攻关项目(2001BA701A07-14)

作者简介: 王宏涛(1972-), 男, 陕西人, 在读博士, 主要从事抗脑缺血的研究, E-mail: wht72@263.net; 徐秋萍(1938-), 女, 北京人, 教授, 博士生导师, 主要从事中风与血管性痴呆的研究。

\*联系作者 Tel: (010)64711199-6084

## 1 材料与方法

### 1.1 动物, 药品, 试剂和仪器

Wistar 大鼠, ♂, 体重  $180 \sim 200 \text{ g}$ , 由中国医学科学院动物研究所提供, 合格证号: SCXK11-00-0006。ISA, 纯度  $> 98\%$ , 无色片状结晶, 由北京中医药大学植化教研室郭亚健教授提供; 尼莫地平(nimodipine, Nim)片剂, 天津中央药业有限公司, 批号: 20000903; ATP 酶测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品, 批号: 20011117。XTT 体视显微镜, 云南光学仪器厂; Waters 510 高效液相色谱仪, 486 型多波长检测器, TL9900 色谱工作站软件系统; 722 型光栅分光光度计, 上海第三分析仪器厂。

### 1.2 大鼠中动脉栓塞模型的制备

大鼠随机分为 6 组, 假手术组, 模型组, ISA  $50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组和 Nim  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组。大鼠用  $10\%$  水合氯醛溶液  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉。按 Tamura 等<sup>[4]</sup>的方法, 稍加改进。大鼠右侧卧位固定, 在眼外眦和外耳道连线中点作一弧形切口, 用牙科钻在颧骨与颞鳞骨接合处靠近口侧  $1 \text{ mm}$  处作一直径  $2.5 \text{ mm}$  骨窗, 暴露大脑中动脉(位于嗅束及大脑下静脉之间)。置一小片塑料薄膜保护血管周围组织。将吸有  $50\%$  三氯化铁溶液  $10 \mu\text{L}$  的小片定量滤纸敷在此段大脑中动脉上,  $30 \text{ min}$  后取下滤纸, 用生理盐水冲洗局部组织, 逐层缝合, 回笼饲养。假手术组除不滴加三氯化铁溶液外, 其余手术步骤同模型组。造模后立即 ig 给药 1 次,  $60 \text{ min}$  后再给药 1 次。

### 1.3 脑组织含水量的测定

大鼠造模  $24 \text{ h}$  后断头取脑, 称量手术侧半脑(右侧)湿重。再置于烘箱中,  $105^\circ\text{C}$  烘烤  $48 \text{ h}$  至恒重, 精确称量干重, 计算含水量百分比<sup>[5]</sup>。

### 1.4 脑组织能荷值的测定

大鼠手术后  $24 \text{ h}$ , 断头取脑。去除嗅球、小脑和低位脑干, 取手术侧半脑, 在  $4^\circ\text{C}$  下沿冠状面去掉脑前端约  $2 \text{ mm}$ , 取随后约  $4 \text{ mm}$  (大脑中动脉区域) 称重, 制成  $10\%$  匀浆  $0.5 \text{ mL}$ , 加入  $3\%$  高氯酸  $0.5 \text{ mL}$ , 沉淀,

1200 × *g* 离心 10 min, 取上清加 40 μL 20% KOH 中和至 pH 7.0。取上清 20 μL 进样, 测定 ATP, ADP, AMP 含量。高效液相色谱条件: 5 μm Spherisorb ODS2 150 mm × 4.6 mm 分离柱; 流动相 0.05 mol · L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 流速 0.8 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm。结果按以下公式计算能量负荷值:

$$\text{能荷}(\%) = (\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}) \times 100\%$$

### 1.5 脑组织 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的测定

大鼠造模后 24 h 迅速断头取脑, 同上法制备 10% 匀浆, 取 200 μL 匀浆按试剂盒说明操作, 660 nm 比色计算 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活力。

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 异亚丙基莽草酸对大脑中动脉栓塞大鼠脑含水量的影响

脑组织缺血后出现水肿, 表 1 模型组与假手术组比较出现明显差异。ISA 术后给药 2 次, ISA 200 mg · kg<sup>-1</sup> 表现出明显的降低脑含水量的作用。

### 2.2 异亚丙基莽草酸对大脑中动脉血栓大鼠脑组织能量代谢的影响

脑组织缺血缺氧后能量代谢障碍, 表 2 中模型组能荷值明显降低, ISA 200 mg · kg<sup>-1</sup> 表现出明显改善能量代谢的作用, 而且随给药剂量增大作用增强。

**Tab 1. Effect of 3, 4-oxo-isopropylidene shikimic acid (ISA) on the water content of brain tissue in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis (MCAT)**

Group	Dose /mg · kg <sup>-1</sup>	<i>n</i>	Water content /%
Sham	-	12	80.04 ± 0.34
Vehicle	-	10	80.46 ± 0.35 <sup>#</sup>
ISA	200	11	80.09 ± 0.41 <sup>*</sup>
	100	11	80.15 ± 0.37
	50	10	80.30 ± 0.62
Nim	5	11	80.49 ± 0.54

ISA or nimodipine (Nim) was administered ig instantly after MCAT for the first time, and 1 h later for the second time. At the same time, the sham and vehicle groups were given ig distilled water. The rats were sacrificed at 24 h after surgery and the water content of brain tissue was determined.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*</sup> *P* < 0.05, compared with vehicle group; <sup>#</sup> *P* < 0.01, compared with sham group.

### 2.3 异亚丙基莽草酸对大脑中动脉栓塞大鼠脑组织 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响

从表 2 看到, 脑组织缺血缺氧后, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活力明显降低, 而给予 ISA 后, 各剂量组均表现出明显的升高酶活力的作用。

**Tab 2. Effect of 3, 4-oxo-isopropylidene shikimic acid on the energy charge (EC) and the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of brain tissue in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis**

Group	Dose /mg · kg <sup>-1</sup>	EC /%	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase /mmol Pi · h <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> protein
Sham	-	18.0 ± 1.6	0.32 ± 0.06
Vehicle	-	15.8 ± 2.7 <sup>#</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>#</sup>
ISA	200	18.0 ± 1.4 <sup>*</sup>	0.35 ± 0.04 <sup>**</sup>
	100	17.8 ± 1.4	0.33 ± 0.07 <sup>**</sup>
	50	16.6 ± 1.7	0.32 ± 0.03 <sup>**</sup>
Nim	5	16.9 ± 1.4	0.31 ± 0.04 <sup>**</sup>

See Tab 1 for the treatments. The rats were sacrificed at 24 h after surgery, and the EC and the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of brain tissue were determined. EC = (ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP) × 100%.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 10 (EC), 8 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase). <sup>\*</sup> *P* < 0.05, <sup>\*\*</sup> *P* < 0.01, compared with vehicle group; <sup>#</sup> *P* < 0.05, <sup>#</sup> *P* < 0.01, compared with sham group.

## 3 讨论

脑组织能量代谢状态可以用能量负荷值表示<sup>[6]</sup>。能荷是指在总的腺苷酸代谢系统中所负荷的高能磷酸根的程度, 即 ATP 生成和利用的平衡关系。生理情况下, 腺苷酸激酶 (ADK) 可催化 ADP 及 ATP 之间的高能磷酸键转移, 即 2ADP ↔ ATP + AMP, 以调节组织细胞的能量代谢平衡。

ATP 是保持膜内外离子平衡的必须条件, 一般来说, ATP 依赖型离子泵 (如 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶等) 大约消耗神经细胞 50% 的 ATP。脑组织缺血缺氧后, 作为合成 ATP 底物的 O<sub>2</sub> 和葡萄糖供应缺乏, 脑组织 O<sub>2</sub> 和葡萄糖自身缺少储备, 而 ATP 的消耗却仍在继续, 因此 ATP 和其他三磷酸腺苷大量丢失<sup>[7]</sup>, 能量代谢发生障碍, 细胞膜上 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶缺乏能源, 故而酶活性降低, 细胞内 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> 和水滞留, 导致细胞水肿<sup>[8]</sup>。

本实验采用三氯化铁诱导大脑中动脉血栓形成模型, 该模型是在 Tamura 等<sup>[4]</sup>建立的大脑中动脉阻

断模型基础上改进而成,其神经症状、脑梗死范围等指标与大脑中动脉阻断模型基本接近<sup>[5]</sup>。实验结果表明脑组织缺血后 24 h 脑组织含水量明显增加,同时脑组织能荷值和  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性降低。给予 ISA 后脑水肿减轻,脑组织能量代谢有一定改善,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力明显提高,因此推测 ISA 可通过改善脑组织能量代谢,进而提高  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力减轻脑组织水肿,保护缺血性损伤的脑组织。

#### 4 参考文献:

- [1] Ma Y, Sun JN, Xu QP, Guo YJ. Inhibitory effects of shikimic acid on platelet aggregation and blood coagulation [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, **35**(1):1-3.
- [2] Ma Y, Xun QP, Sun JN, Bai LM, Guo YJ, Niu JZ. Antagonistic effects of shikimic acid against focal cerebral ischemia injury in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1999, **20**(8):701-704.
- [3] Wang HT, Jin HT, Sun JN, Xun QP, Guo YJ. Experimental studies on the anti-thrombosis effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, **37**(4):245-248.
- [4] Tamura A, Graham DI, McCullouch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in rat. 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, **1**(1):53-60.
- [5] Liu XG, Xu LN. A rat middle cerebral artery thrombosis model for evaluation of thrombolytic and antithrombotic agents[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, **30**(9):662-667.
- [6] Shen T, Wang JY. *Biochemistry* (生物化学)[M], 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1991. 428.
- [7] Macdonald RL, Stoodley M. Pathophysiology of cerebral ischemia[J]. *Neurol Med Chir* (Tokyo), 1998, **38**(1):1-11.
- [8] Nomoto EM, Hossmann KA, Cooper HK. Rost-ischemic hypermetabolism in cat brain[J]. *Stroke*, 1981, **12**(5):666-676.

## Effect of 3,4-oxo-isopropylidene shikimic acid on brain edema and energy metabolism in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis

WANG Hong-Tao, SUN Jian-Ning, XU Qiu-Ping, GUO Ya-Jian

(Department of Pharmacology, College of Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate whether the improvement effect of 3, 4-oxo-isopropylidene shikimic acid (ISA) on the ischemic injury is related to the improvement of energy metabolism and the abatement of brain edema. **METHODS** Adopt a middle cerebral artery thrombosis (MCAT) model induced by  $\text{FeCl}_3$  to determine the brain tissue water content,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and energy charge, the latter was measured with HPLC. ISA was administered ig instantly after MCAT for the first time, and 1 h later for the second time. **RESULTS** ISA  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig decreased the water content of brain tissue; ISA 100 and  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig increased the energy

charge and ISA 50, 100 and  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig increased the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in rat brain tissue. **CONCLUSION** ISA relieves the brain edema of rats subjected to MCAT by improving the energy metabolism and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in rat brain tissue.

**Key words:** Shikimic acid; thrombosis; cerebral arteries; cerebral ischemia; energy metabolism; adenosine triphosphatase, sodium, potassium

**Foundation item:** State Administration of Traditional Chinese Medicine "the 10th Five-year Project" Program

(本文编辑 乔虹)