

丁香 3 种提取物对寒证大鼠脑内神经递质及环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷的影响

黄燕琼¹, 秦华珍^{2*}, 李世阳², 时博², 梁艳君², 柳俊辉², 刘磊², 郑作文²

(1. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530011; 2. 广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 通过观察丁香的 3 种提取物(挥发油、水提液、去挥发油水提液)对寒证大鼠脑内神经递质去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、及环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)的影响, 探讨丁香 3 种提取物与温热药性的相关性, 以及入煎剂的科学性。方法: 设空白对照组、模型对照组、模型对照组、阳性对照组、丁香 3 种提取物高、低剂量组, 用寒凉药复制大鼠寒证模型, 荧光光度法测定 NE, DA 的含量, 酶联法测定 5-HT 的含量; 放免法测定 cAMP, cGMP 的含量。结果: 丁香水提液高剂量、挥发油高、低剂量、去挥发油水提液高剂量组均能增加 NE 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。丁香水提液与挥发油高、低剂量组, 去挥发油水提液高剂量组均能增加 DA 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 减少 5-HT 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 丁香水提液与去挥发油高剂量组, 挥发油高、低剂量组均能增加 cAMP 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 升高 cAMP/cGMP 比值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但对 cGMP 没有显著影响。结论: 丁香不同提取物能促进寒证大鼠脑内 NE, DA 的合成, 抑制 5-HT 的释放, 通过促进大脑皮层中 cAMP 的合成, 调节大脑皮层中 cAMP 和 cGMP 的平衡; 丁香挥发油与其温热药性存在相关性, 而水提液、去挥发油水提液部分也存在与温热药性相关的活性成分, 以煎剂入药具有科学性。

[关键词] 丁香; 神经递质; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0153-03

丁香为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb. 花蕾。其药性温热, 属于温里药, 具有温中散寒止痛的功效, 临床常用于脘腹冷痛等寒证。丁香临床用药以入煎剂为主, 但本品含有丰富的挥发油, 挥发油在水中的溶解度很小。为了探讨丁香挥发油与其温热药性的相关性及入煎剂的科学性, 笔者对丁香的 3 种不同提取物对寒证大鼠脑内神经递质去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、及环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)的影响进行了实验研究。

1 材料

1.1 动物 健康雌性 SD 大鼠, 清洁级, 体重(200 ± 20) g, 广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(桂) 2003-0003。

1.2 受试药物 丁香购自南宁市景昌中药饮片有限公司, 并经广西中医学院中药鉴定学教研室蔡毅教授鉴定为正品。

1.2.1 丁香水提液制备 取丁香饮片 1 kg, 加 10 倍量水浸透药材, 煎煮 30 min, 趁热过滤, 残渣加 8 倍量水, 煎煮 20 min, 趁热过滤, 合并滤液, 冷却; 加入 2 倍量的乙醇除去杂质, 回收乙醇, 浓缩成浸膏, 密封放入 4℃ 冰箱保存。

1.2.2 丁香挥发油提取^[1] 取丁香饮片 1 kg, 加 10 倍量水浸透药材, 采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 连续回流至油量不再增加为止, 收集挥发油, 用棕色瓶装, 密封, 于 4℃ 冰箱保存, 用时以 5% 吐温-80 配制成所需浓度。

1.2.3 丁香去挥发油水提液制备 将 1.2.2 中提取挥发油后剩余的水提液, 趁热过滤, 冷却, 加 2 倍量的乙醇除去杂质, 回收乙醇, 浓缩成浸膏, 密封, 于 4℃ 冰箱保存。

1.2.4 阳性药的制备 取 1 kg 附子饮片, 加 10 倍量水浸透药材, 煎煮 1 h, 过滤; 残渣加 8 倍量水, 煎煮 1 h, 过滤, 合并滤液, 于 4℃ 冰箱静置过夜。取上清液减压浓缩至密度为 1.05(20℃); 加入 2 倍量的乙醇除去杂质, 回收乙醇, 浓缩至无醇味, 加蒸馏水

[收稿日期] 20100302(005)

[基金项目] 广西中医学院高层次人才科研启动基金课题

[第一作者] 黄燕琼, 中药学在职研究生, 研究方向为中药基础理论与中药药效研究。

[通讯作者] * 秦华珍, 中药学博士, 教授, 研究方向为中药基础理论与中药药效研究, Tel: 13807816597, E-mail: qinhuazhen@126.com

配制成 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液, 密封放入 4°C 冰箱保存。用时以蒸馏水配制成所需浓度。

1.3 试剂 吐温-80, 批号 F990622, 上海化学试剂公司。5-HT 酶免试剂盒, 批号 RT110371, 南京建成生物工程研究所; 环磷酸腺苷(cAMP), 环磷酸鸟苷(cGMP) 放免试剂盒, 批号 20081030, 上海中医药大学核医学实验室; 重酒石酸去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA) 盐酸盐, 均购自 Fluka 公司。

1.4 仪器 RF5301PC 荧光分光光度计, 日本岛津; LD4-18 台式低速离心机, 北京离心机有限公司; ER-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; ELX-800 酶标仪, 美国宝特; GC-911 放射性免疫计数仪, 科大创新股份有限公司中佳分公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药途径、给药剂量 取大鼠 100 只, 随机分为空白对照组、模型生理盐水对照组、模型吐温-80 对照组、附子阳性对照组、丁香水提液高、低剂量组、丁香挥发油高、低剂量组、丁香去挥发油水提液高、低剂量组(以下简称为空白、模型、模型、阳性、水高、水低、挥高、挥低、去挥高、去挥低)共 10 个组, 每组 10 只。均 ig 给药, 给药体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。丁香 3 种提取物的给药剂量(按生药量计)均为低剂量组 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 高剂量组 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 模型建立及实验操作 以上各组大鼠均 ig 寒凉药(知母 石膏 龙胆草 黄柏按 1.5 2 1 1)水提液(相当于原生药量 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)造模^[2], 空白组 ig 给予等容积蒸馏水。每日 1 次, 连续给药 14 d。第 15 d 给造模药物 3 h 后对应各组分别给予丁香各种

提取液, 阳性组给予附子水提醇沉液 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 空白与模型组均 ig 等容积生理盐水, 模型组 ig 等容积 5% 吐温-80 溶液。连续给药 7 d, 末次给药前各组大鼠禁食不禁水 12 h, 给药 2 h 后 ip 20% 乌拉坦溶液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠, 于枕骨大孔处断头处死, 取脑干及大脑皮层, 用生理盐水漂洗掉血迹后迅速储存于超低温冰箱(-80°C)。测定时取脑干室温放置至解冻, 用滤纸吸干水分, 称定湿重; 加 $4 \text{ mL} 0.9\%$ 冰生理盐水, 匀浆, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液, 备用。取 1 mL 脑干匀浆按照酶免试剂盒操作说明测定 5-HT 含量; 取脑干匀浆 3 mL , 加入酸性正丁醇 5 mL , 振荡 10 min, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上层正丁醇 2 mL , 按照荧光分光光度法^[3]测定 NE, DA 含量。取大脑皮层室温放置至解冻, 用滤纸吸干水分, 取左脑皮层前段 50 mg 左右, 称定湿重。放入含有 2 mL 冷的醋酸缓冲液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH4.75)的试管中, 冰浴匀浆, 加入 2 mL 无水乙醇, 混匀, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 将上清液收集在青霉素小瓶内, 再用 $2 \text{ mL} 75\%$ 乙醇洗沉淀, 匀浆分散, 混匀, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取上清液, 合并上清液, 60°C 烘箱中恒温烘干, 残渣用 1 mL 醋酸缓冲液溶解作为样品, 按照放射免疫试剂盒操作说明测定大脑皮层中 cAMP, cGMP 含量。

2.3 统计学处理 所有数据均采用 SPSS11.0 进行统计学处理, 多组间样本均数比较采用方差分析, 组间比较采用两样本均数的 t 检验, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有显著性差异。

3 结果

3.1 对寒证大鼠脑干内神经递质的影响, 见表 1。

表 1 丁香对寒证大鼠脑干内 DA, NE, 5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	NE/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	DA/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	5-HT/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
空白	-	0.440 ± 0.119	0.388 ± 0.040	1.276 ± 0.147
模型	-	0.338 ± 0.078	0.325 ± 0.077	1.566 ± 0.268
模型	-	0.335 ± 0.084	0.326 ± 0.063	1.564 ± 0.273
附子	8	$0.466 \pm 0.057^{2)}$	$0.422 \pm 0.066^{2)}$	$1.199 \pm 0.212^{2)}$
丁香水低	6	0.419 ± 0.090	$0.382 \pm 0.022^{1)}$	$1.359 \pm 0.143^{1)}$
丁香水高	12	$0.458 \pm 0.128^{2)}$	$0.409 \pm 0.042^{2)}$	$1.254 \pm 0.110^{2)}$
丁香挥低	6	$0.425 \pm 0.088^{3)}$	$0.389 \pm 0.053^{3)}$	$1.309 \pm 0.141^{3)}$
丁香挥高	12	$0.473 \pm 0.092^{4)}$	$0.410 \pm 0.039^{4)}$	$1.222 \pm 0.172^{4)}$
丁香去挥低	6	0.395 ± 0.055	0.377 ± 0.039	1.376 ± 0.199
丁香去挥高	12	$0.438 \pm 0.043^{2)}$	$0.410 \pm 0.037^{2)}$	$1.256 \pm 0.200^{2)}$

注: 与模型 相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型 相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 1 显示: 造模各组 NE, DA 的含量均较空白组减少, 5-HT 的含量较空白组增多。丁香水高、挥低、

挥高、去挥高组能增加 NE 的含量,与模型 , 比较, 挥低组有显著性差异 ($P < 0.05$), 水高、挥高、去挥高组有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 水低、去挥低组作用不显著。丁香水低、水高、挥低、挥高、去挥高组能增加 DA 的含量,降低 5-HT 的含量。与模型

, 比较, 水低、挥低组有显著性差异 ($P < 0.05$), 水高、挥高、去挥高组有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 去挥低组作用不显著。

3.2 对寒证大鼠大脑皮层中 cAMP, cGMP 含量的影响 见表 2。

表 2 丁香对寒证大鼠大脑皮层内 cAMP, cGMP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	cAMP / $pmol \cdot g^{-1}$	cGMP / $pmol \cdot g^{-1}$	cAMP/cGMP
空白	-	259.65 \pm 42.54	6.32 \pm 1.06	41.46 \pm 6.03
模型	-	194.33 \pm 60.66	6.11 \pm 1.33	31.75 \pm 6.73
模型	-	196.24 \pm 59.87	5.85 \pm 1.46	33.28 \pm 3.64
附子	8	310.92 \pm 94.98 ²⁾	6.47 \pm 2.31	49.22 \pm 5.73 ²⁾
丁香水低	6	205.88 \pm 32.79	5.53 \pm 1.25	38.09 \pm 5.98
丁香水高	12	278.42 \pm 52.31 ¹⁾	6.33 \pm 1.40	44.89 \pm 6.94 ²⁾
丁香挥低	6	272.77 \pm 45.97 ³⁾	5.95 \pm 1.15	49.98 \pm 15.05 ³⁾
丁香挥高	12	295.50 \pm 46.44 ⁴⁾	5.61 \pm 1.62	58.23 \pm 23.64 ³⁾
丁香去挥低	6	238.89 \pm 42.12	6.11 \pm 2.08	40.32 \pm 8.87
丁香去挥高	12	265.40 \pm 54.58 ¹⁾	6.15 \pm 1.89	44.89 \pm 8.88 ²⁾

表 2 显示: 造模各组中 cAMP 的含量较空白组减少。丁香水高、挥低、挥高、去挥高组均能增加 cAMP 的含量。与模型 , 比较, 水高、挥低、去挥高组有显著性差异 ($P < 0.05$), 挥高组有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 以上各组对 cGMP 含量均没有显著的影响。丁香水高、挥低、挥高、去挥高组均能提高 cAMP/cGMP 的比值,与模型 , 比较, 挥高、挥低组有显著性差异 ($P < 0.05$), 水高、去挥高组有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

4 讨论

据报道: 寒证动物脑内 NE, DA 含量降低, 5-HT 含量升高, 使中枢处于抑制状态。当停止喂寒凉药后, 此状态仍可持续 7 d 以上。而温热药能使脑内 NE, DA 含量增多, 5-HT 含量减少, 增强中枢的兴奋性^[4-5]。由此推测: 温热药性与脑内神经递质存在一定的联系。

本实验结果显示: 寒证大鼠脑内 NE, DA 含量降低, 5-HT 含量升高, 与文献报道结果一致。丁香水高、挥高与挥低、去挥高组均能增加寒证大鼠脑内 NE, cAMP 的含量, 升高 cAMP/cGMP 比值。丁香水提液与挥发油高与低、去挥高组均能增加寒证大鼠脑干内 DA 的含量, 降低 5-HT 的含量。实验结果表

明: 丁香挥发油的药效优于水煎液组与去挥发油组, 而水高、去挥高组也有效。由此说明: 丁香挥发油与温热药性存在较密切的相关性; 而水煎剂与去挥发油部分与温热药性也存在一定的相关性, 说明除了挥发油以外, 还有其他的物质基础; 以水煎液入药具有科学依据。而增加 cAMP 含量、升高 cAMP/cGMP 比值, 可能是反映丁香药性的一个重要分子机制。至于除了挥发油之外, 丁香温热药性的其他物质基础是什么, 还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 57.
- [2] 梁月华, 谢竹藩. 中医寒热本质的初步研究 [J]. 中华医学杂志, 1979, 59(12): 705.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验法 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 459.
- [4] 宋辉, 梁月华. 温阳和补气药对虚寒证大鼠神经内分泌的影响 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(3): 182.
- [5] 梁月华, 施天华, 任红. 形成虚热证的中枢兴奋物质的研究 [J]. 中医杂志, 1998, 39(8): 493.

[责任编辑 聂淑琴]