

• 药理 •

复方归苓片提取物对反复缺血再灌注 诱导脑损伤的保护作用

肖志兵, 林志宏, 朱丹妮*, 严永清, 余伯阳
(中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

[摘要] 目的: 考察中药复方归苓片(茯苓、白术、当归, FDB)提取物对缺血再灌注诱导小鼠脑损伤的保护作用。方法: 小鼠预先 ig 给予 FBD CO₂ 超临界萃取物(FBD-CO₂, 37.5 mg·kg⁻¹)、水提物(FBD-H₂O, 150 mg·kg⁻¹)与总提物(FBD, 187.5 mg·kg⁻¹), bid×3.5 d, 应用双侧颈总动脉反复夹闭 10 min 与再灌注 24 h 诱导小鼠神经炎症与脑损伤, 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色法检测脑梗死, 伊文思蓝法检查血脑屏障(BBB)通透性, 分类计数血液白细胞, 比色法测定脑组织髓过氧化物酶(MPO)活性、前列腺素 E₂(PGE₂)与一氧化氮(NO)水平。结果: FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 均可显著抑制 BBB 通透性升高($P < 0.05$), 并显著保持血液白细胞数量($P < 0.05 \sim 0.001$), 抑制脑组织 MPO 活性($P < 0.01 \sim 0.001$), 防止中性粒细胞中枢浸润; 其中, FBD 与 FBD-CO₂ 可显著减少脑梗死面积($P < 0.05$), 降低脑组织 PGE₂ 与 NO 水平($P < 0.05 \sim 0.001$)。结论: FBD 具有抗炎与神经保护作用, 其抗炎与神经保护机制可能与 FBD-CO₂ 抑制中性粒细胞中枢浸润, 减少炎症介质 PGE₂ 与 NO 生成有关。

[关键词] 归苓片; 神经炎症; 缺血性中风; 神经保护作用; 抗炎作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0029-04

Neuroprotective Effects of Extracts of Guiling Pill on Ischemic-Reperfusion Induced Brain Injury

XIAO Zhi-bing, LIN Zhi-hong, ZHU Dan-ni*, YAN Yong-qing, YU Bo-yang

(Department of Chinese Medicinal Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammatory and neuroprotective action of Guiling Pill (Fuling, Baizhu and Danggui, FBD) on ischemic-reperfusion induced brain injury. **Methods:** Mice were orally administered 37.5 mg·kg⁻¹ supercritical fluid extract of FBD (FBD-CO₂), 150 mg·kg⁻¹ aqueous extract (FBD-H₂O), and 187.5 mg·kg⁻¹ both (FBD) beforehand, twice daily for 3.5 d, and subjected to repetitive 10 min ischemia and 24 h reperfusion, then brain infarction was observed by 2, 3, 5-triphenyltertrazolium chloride (TTC) staining, the permeability of BBB was examined by Evans Blue dyeing, the total blood leukocytes and its three subpopulations were counted while cerebral myeloperoxidase (MPO) activity was detected, and levels in prostaglandin E₂ (PGE₂) and nitric oxide (NO) were assayed by spectrophotometry. **Results:** Compared with the saline-pretreated mice, oral pretreatment with FBD or FBD-CO₂ had not only obviously less Evans Blue influx, and brain infarction, but also recruitment of leukocytes, evidenced with maintained circulating neutrophils counts and low cerebral MPO activity; excessive cerebral prostaglandin E₂ (PGE₂), and nitric oxide (NO) production were markedly also restrained by FBD-CO₂, rather than FBD-H₂O. **Conclusion:** FBD

[收稿日期] 2007-06-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30500683); 江苏省博士生创新基金(200593)

[通讯作者] * 朱丹妮, Tel: (025) 85391042; E-mail: danizhu@163.com

exerted an anti-inflammatory and neuroprotective action on cerebral I/R, partially via inhibition of neutrophils recruitment and generation of NO and PGE₂. Its anti-inflammatory effect was mainly related with FBD-CO₂.

[**Key words**] Guiling Pill; neural inflammation; ischemic stroke; neuroprotective; anti-inflammatory

炎症密切参与中风的发病过程,其特征为星形胶质细胞、小胶质细胞激活以及外周白细胞中枢浸润^[1~2]。在脑缺血再灌注(ischemic reperfusion, I/R)早期,中性粒细胞首先浸润,并大量释放氧自由基、蛋白水解酶、细胞因子,引起大脑继发性损伤^[3~4]。

归苓片(FBD)为 CO₂ 超临界萃取联合水提取工艺制成的中药制剂,由茯苓、白术、当归组成,具有健脾利湿、祛痰活血功效,可用于缺血性中风(ischemic stroke)与血管性痴呆(vascular dementia)治疗。前期研究发现,FBD 可通过抗氧化、膜稳定与抗神经毒等途径,改善缺血再灌注(ischemic reperfusion, I/R)诱导脑损伤。据文献报道,茯苓、白术与当归可抑制白细胞花生四烯酸代谢和细胞因子释放^[5],且其抗炎作用主要来自脂溶性成分,如茯苓三萜等^[6]。FBD 是否也具有抗炎作用,进而参与 FBD 神经保护机制,值得深入调查。为此,本研究初步考察了 FBD 及其 CO₂ 超临界萃取物与水提物,对 I/R 诱导小鼠神经炎症与脑损伤的影响。

1 材料

1.1 FBD 提取物制备 归苓片(FBD)由白茯苓、炒白术、当归 3 味中药组成,从提取工艺分为 CO₂ 超临界流体萃取部位与 H₂O 提取部位。药材均购自南京市药材公司,经本校生药学余伯阳教授鉴定,原植物分别为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 与伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。FBD 组方比例为:茯苓:白术:当归(10 g:5 g:3 g);3 味中药按比例混合,夹带剂 95% 乙醇浸泡 30 min,应用 CO₂ 超临界流体萃取,条件为压力 25.0 MPa,温度 38 °C,CO₂ 流速 110 kg·h⁻¹,得 CO₂ 提取物(FBD-CO₂),得率 2.75%;剩余药渣,继续用水提取 1 次,得水提物(FBD-H₂O),得率 9.75%。FBD 总提物由 FBD-H₂O 与 FBD-CO₂ 组成,得率 12.5%。

1.2 药品与试剂 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC 上海生工,AMRESCO 分装,批号:3519A09);N-萘基乙二胺、对氨基苯磺酰胺、伊文斯蓝 N,N-二甲基甲酰胺、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂, Sigma 公

司);Griess 试剂(0.1% N-萘基乙二胺、5% H₃PO₄ 与 1% 对氨基苯磺酰胺);髓过氧化物酶 MPO 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所提供,批号:20060628)。

1.3 动物 ICR 小鼠,雄性,体重 28 ± 3g,中国药科大学新药筛选中心提供。

1.4 仪器 DU640 核酸蛋白分析仪(美国 Beckman coulter 公司);血细胞计数器(Sysmex XE-2100, Kobe, Japan);Z323K 冷冻高速离心机(德国 Herle labor technik 公司);Zeiss AxioVs 40 图像分析仪(Oberkochen, Germany)。

2 方法

2.1 药物预处理 预实验显示,187.5, 375 mg·kg⁻¹ FBD 可显著抑制伊文斯蓝 BBB 通透。本研究选择 187.5 mg·kg⁻¹ FBD 用于作用机制研究。ICR 小鼠分为 FBD 提取物组、假手术组与模型组,FBD 提取物组分别 ig 给予 187.5 mg·kg⁻¹ FBD, 37.5 mg·kg⁻¹ FBD-CO₂, 150 mg·kg⁻¹ FBD-H₂O,假手术组和模型组 ig 给予等量生理盐水,bid × 3.5 d。

2.2 动物模型 第 7 次给药后 1 h,1.2 g·kg⁻¹ 20% 乌拉坦 ip 麻醉小鼠,钝性分离双侧颈总动脉(common carotid arteries, CCA),应用双侧颈总动脉反复夹闭,38 °C 下执行 10 min F-10 min R-10 min I,小鼠断尾失血 0.2 mL,假手术组仅暴露双侧 CCA,术后小鼠 37 °C 下光照保温 24 h。

模型制备 3 批,分别用于神经组织学、神经化学与血液学检查。

2.3 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 诱导 BBB 通透性与脑梗死的影响 在小鼠 I/R 后 23 h 尾静脉注射 0.2 mL 伊文斯蓝(0.5% 生理盐水溶液),1 h 后取脑在 N,N-二甲基甲酰胺溶液(m/v = 1:10)中浸泡 24 h 提取伊文斯蓝,提取液在 632 nm 处用 ELISA 酶标仪检测伊文斯蓝浓度。

I/R 后 24 h 取脑,去除软脑膜与血块后在脑垂体沿冠状切厚 2.0 mm 薄片(2~3)片,立即置于 2% TTC 溶液中避光孵育 30 min,中性 10% 福尔马林继续固定 45 min。数码相机拍照后用 Zeiss AxioVs 40 图像分析系统测量白色脑梗死面积。脑梗死计算公

式为: 脑梗死百分比 (%) = (白色梗死面积/脑片总面积) × 100%。

2.4 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 诱导白细胞中枢浸润的影响 小鼠在 I/R 后 24 h 采集血液与脑组织, 血液 EDTA-K₂ 抗凝后, 用于总白细胞及中性粒细胞、淋巴细胞与单核细胞计数; 大脑制备成 20% 匀浆, 按照试剂盒方法检测 MPO 活性。

2.5 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 脑组织 PGE₂ 与 NO 的影响 小鼠在 I/R 后 24 h 采集脑组织, 制备成 10% 匀浆, 10% 的 ZnSO₄ 沉淀蛋白, 4 000 r·min⁻¹ × 10 min 离心, Griess 法 550 nm 下比色测定 NO 浓度, 278 nm 下比色测定 PGE₂ 浓度。

2.6 统计分析 应用 Origin7.0 与 Excel 软件进行数据统计分析, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较组间差异行 *t*/*t'* 检验。

3 结果

3.1 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 诱导 BBB 通透性与脑梗死的影响 由表 1 可见, 小鼠在脑缺血 I/R 后 24 h, 脑组织伊文斯蓝含量显著升高 (*P* < 0.01), 脑梗死面积显著增加 (*P* < 0.01)。与模型组比较, FBD 和 FBD-CO₂ 明显减少脑组织伊文斯蓝含量与梗死面积 (*P* < 0.05), FBD-H₂O 也可一定程度减少脑梗死面积与伊文斯蓝含量, 提示 FBD 和 FBD-CO₂ 可对抗 BBB 破坏与脑损伤, 具有神经保护作用。

表 1 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 诱导 BBB 通透性与脑梗死的影响

Tab. 1 Effects of FBD, FBD-CO₂ and FBD-H₂O on brain infarction and BBB penetrability in ICR mice injured by cerebral ischemia reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose (mg·kg ⁻¹)	Brain infarction (%)	Evans Blue (μg·mL ⁻¹)
Sham	—	5.61 ± 5.32 ²⁾	1.97 ± 0.19 ²⁾
I/R	—	36.60 ± 6.10	10.30 ± 2.10
FBD	187.5	26.75 ± 3.61 ¹⁾	5.88 ± 2.66 ¹⁾
FBD-CO ₂	37.5	18.91 ± 9.18 ¹⁾	6.44 ± 2.09 ¹⁾
FBD-H ₂ O	150.0	34.53 ± 16.00	5.72 ± 2.42 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01, ³⁾ *P* < 0.001 (下同)

3.2 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 诱导白细胞中枢浸润的影响 如表 2 所示, 与对照组比较, 脑缺血再灌注组小鼠脑组织 MPO 活性显著升高 (*P* < 0.01); 与模型组比较 FBD, FBD-CO₂/H₂O 可显著抑制小鼠脑组织中 MPO 活性 (*P* < 0.01~0.001), 其中以 FBD-CO₂ 作用最显著。

此外, 与对照组相比较, 小鼠在脑缺血再灌注后, 外周血液中总白细胞数显著降低 (*P* < 0.05), 其中中性粒细胞数降低最为显著; 与模型组比较, FBD 与 FBD-CO₂ 可显著升高外周血白细胞总数 (*P* < 0.05) 和中性粒细胞数 (*P* < 0.001); FBD-H₂O 也能显著增加中性粒细胞数 (*P* < 0.05)。

表 2 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 诱导白细胞中枢浸润的影响

Tab. 2 Effects of FBD, FBD-CO₂ and FBD-H₂O on leukocytes, neutrophils, lymphocytes and monocytes in blood of ICR mice injured by cerebral ischemia reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Group	Dose (mg·kg ⁻¹)	Leukocytes (10 ⁹ ·L ⁻¹)	Neutrophils (10 ⁹ ·L ⁻¹)	Lymphocytes (10 ⁹ ·L ⁻¹)	Monocytes (10 ⁹ ·L ⁻¹)	MPO (U·g ⁻¹)
Sham	—	3.48 ± 1.39 ¹⁾	1.10 ± 0.56 ¹⁾	2.14 ± 0.01	0.43 ± 0.19	0.12 ± 0.10 ²⁾
I/R	—	1.80 ± 0.95	0.57 ± 0.14	1.38 ± 0.10	0.40 ± 0.31	0.27 ± 0.06
FBD	187.5	3.47 ± 0.90 ¹⁾	1.70 ± 0.46 ³⁾	1.73 ± 0.21	0.33 ± 0.25	0.11 ± 0.06 ²⁾
FBD-CO ₂	37.5	3.00 ± 0.86 ¹⁾	0.92 ± 0.43 ³⁾	1.87 ± 0.45	0.42 ± 0.33	0.02 ± 0.05 ³⁾
FBD-H ₂ O	150	2.63 ± 0.81	1.23 ± 0.85 ¹⁾	1.73 ± 0.08	0.20 ± 0.17	0.06 ± 0.08 ²⁾

3.3 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 脑组织 PGE₂ 与 NO 的影响 结果如表 3, 与对照组相比较, 小鼠在脑缺血再灌注后, 脑组织 NO 与 PGE₂ 含量显著升高 (*P* < 0.01); 与模型组比较 FBD 组, FBD-CO₂ 组小鼠脑组织中 NO 与 PGE₂ 含量显著降低 (*P* < 0.05~0.001); FBD-H₂O 对 NO 与 PGE₂ 含量影响不大。

表 3 FBD 与 FBD-CO₂/H₂O 对 I/R 脑组织 PGE₂ 与 NO 的影响

Tab. 3 Effect of FBD, FBD-CO₂ and FBD-H₂O on NO content, and PGE₂ content in cerebra of ICR mice injured by ischemia reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Group	Dose (mg·kg ⁻¹)	NO (μg·g ⁻¹)	PGE ₂ (mg·g ⁻¹)
Sham	—	0.09 ± 0.009 ²⁾	0.47 ± 0.02 ²⁾
I/R	—	0.11 ± 0.005	0.57 ± 0.07
FBD	187.5	0.09 ± 0.003 ³⁾	0.50 ± 0.02 ¹⁾
FBD-CO ₂	37.5	0.09 ± 0.007 ³⁾	0.49 ± 0.04 ¹⁾
FBD-H ₂ O	150.0	0.10 ± 0.018	0.58 ± 0.05

4 讨论

急性脑缺血引起神经元损伤, 可激活神经胶质细胞与外周白细胞中枢浸润。激活白细胞通过呼吸爆发与脱颗粒, 分泌大量的氧自由基、蛋白水解酶与炎性介质 (NO、PGE₂ 等) 等神经毒性物质, 引起 BBB 破坏与大脑继发性损伤, 在脑缺血转变为脑梗死过程中发挥重要作用^[9]。本研究发现, FBD 总提物及 FBD-CO₂ 能保持血液中中性粒细胞数, 并同时降低

脑组织中中性粒细胞特征酶 MPO 活性, 说明 FBD 总提物及 FBD-CO₂ 能通过抑制中性粒细胞中枢浸润, 防止 BBB 通透性破坏与脑梗死。

此外, 脑缺血可激活诱导型 NO 合成酶 (iNOS) 和神经元型 NO 合成酶 (nNOS), 释放过量 NO, 能直接损伤神经元, 并激活环氧酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 产生 PGE₂, 加重中枢炎症反应^[7]。预先给予 FBD 总提物可减少脑组织 PGE₂ 与 NO 生成, 提示 FBD 抗炎作用, 可能与抑制 iNOS 或 NOS 以及 COX-2 活性, 进而减少 NO 与 PGE₂ 生成有关。且 FBD 抗炎与神经保护作用, 主要来自 FBD-CO₂。

茯苓、白术、当归为常用抗炎药用植物, 含有大量的抗炎活性成分, 如藁本内酯 (ligustilide)、茯苓酸 (pachymic acid)、3β-对-羟基苯甲酰基去氢土莫酸 (3β-p-hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid) 等^[8-10], FBD 抗脑缺血性疾病的活性成分及其作用机制, 尚有待后续研究探索。

[参考文献]

- [1] Chamorro A., Hallenbeck J. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease[J]. *Stroke*, 2006, 37: 291-293.
- [2] Samson Y., Lapergue B., Hosseini H. Inflammation and ischaemic stroke: current status and future perspectives[J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2005, 161: 1177-1182.
- [3] Dinkel K., Dhabhar F. S., Sapolsky R. M. Neurotoxic

effects of polymorphonuclear granulocytes on hippocampal primary cultures[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 331-336.

- [4] Danton G. H., Dietrich W. D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62: 127-136.
- [5] Prieto J. M., Recio M. C., Giner R. M., *et al.* Influence of traditional Chinese anti-inflammatory medicinal plants on leukocyte and platelet functions[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55: 1275-1282.
- [6] Schinella G. R., Tournier H. A., Prieto J. M., *et al.* Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts[J]. *Life Sci* 2002, 70: 1023-1033.
- [7] Schroeter M., Kurv P., Jander S. Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice[J]. *Mol Brain Res*, 2003, 117: 1-7.
- [8] Leslie G., Zaisen W., Jan G., *et al.* Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332: 1153-1161.
- [9] Kuang X., Yao Y., Du J. R., *et al.* Neuroprotective role of *Z-ligustilide* against forebrain ischemic injury in ICR mice [J]. *Brain Res*, 2006, 1102: 145-153.
- [10] Yasuksws K., Kaminaga T., Kitanaka S., *et al.* 3β-p-hydroxybenzoyldehydrotumulosic acid from *Porio cocos*, and its anti-inflammatory effect[J]. *Phytochemistry*, 1998, 48: 1357-1360.