

黄连解毒汤对脑缺血模型大鼠丘脑中氨基酸含量的影响

郭 响*, 庄 伟, 林晓兰, 张 鹏, 周京燕, 杨立平(首都医科大学宣武医院药剂科, 北京 100053)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2216-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.18

摘要 目的:研究黄连解毒汤对脑缺血模型大鼠丘脑中氨基酸谷氨酸(Glu)与 γ -氨基丁酸(GABA)含量的影响。方法:采用线栓法复制大鼠脑缺血模型。48只大鼠随机均分假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、黄连解毒汤药材水提取物(简称水提取物,800 g/kg)组、黄连解毒汤药材总生物碱(简称总生物碱,44 mg/kg)组、黄连解毒汤药材总黄酮(简称总黄酮,50 mg/kg)组、黄连解毒汤药材总环烯醚萜(简称总环烯醚萜,80 mg/kg)组,复制模型成功2 h后ig给药,q12 h,连续7 d。采用2-巯基乙醇(OPA)-柱前衍生高效液相荧光检测法测定大鼠丘脑中Glu和GABA含量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠丘脑中Glu、GABA含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,水提取物组、总生物碱组、总黄酮组、总环烯醚萜组大鼠丘脑中Glu含量增加,总黄酮组大鼠丘脑中GABA含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:黄连解毒汤药材总黄酮可促进脑缺血模型大鼠丘脑中Glu、GABA含量恢复至正常水平,其与黄连解毒汤抗脑缺血、促进脑功能恢复的关系值得深入研究。

关键词 黄连解毒汤;脑缺血;谷氨酸; γ -氨基丁酸;高效液相荧光检测法;大鼠

Effects of Huanglian Jiedu Decoction on the Content of Amino Acid in the Thalami of Model Rats with Cerebral Ischemia

GUO Xu, ZHUANG Wei, LIN Xiao-lan, ZHANG Peng, ZHOU Jing-yan, YANG Li-ping (Dept. of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Huanglian jiedu decoction on the content of glutamic acid (Glu) and γ -aminobutyric acid (GABA) in the thalami of model rats with cerebral ischemia. METHODS: The suture-occluded method was adopted to establish the model rats with cerebral ischemia. 48 rats were randomly divided into sham-operation group (isometric normal saline), model group (isometric normal saline), group of aqueous extract from medicinal materials of Huanglian jiedu decoction (hereinafter referred to as aqueous extract, 800 g/kg), group of total alkaloids of thereof (hereinafter referred to as total alkaloids, 44 mg/kg), group of total flavones thereof (hereinafter referred to as total flavones, 50 mg/kg), and group of total iridoids thereof (hereinafter referred to as total iridoids, 80 mg/kg). The drugs were given to the rats 2 h after successful establishment of the models, ig, q12 h, for consecutive 7 d. 2-mercaptoethanol (OPA) pre-column derivatization HPLC with fluorescence detection was employed to determine the contents of Glu and GABA in the thalami of the rats. RESULTS: Compared with sham-operation group, the contents of Glu and GABA in the thalami of the rats in model group were decreased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with model group, the contents of Glu in the thalami of the rats in the aqueous extract group, the total alkaloids group, the total flavones group and the total iridoids group were increased, and the contents of GABA in the thalami of the rats in the total flavones group were increased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: The total flavonoids of medicinal materials of Huanglian jiedu decoction can return the contents of Glu and GABA to normal levels in the thalami of model rats with cerebral ischemia, and the relationship with the recoveries of anti-cerebral ischemia and promoting brain function of Huanglian jiedu decoction is worthy of further study.

KEYWORDS Huanglian jiedu decoction; Cerebral ischemia; Glutamic acid; γ -aminobutyric acid; HPLC with fluorescence detection; Rats

黄连解毒汤源于唐代王焘的《外台秘要》,由黄芩、黄连、黄柏和栀子4味中药组成,具有清热、泻火、解毒之功效,主治一切实热火毒、三焦热盛之证^[1]。现代药理学研究表明,该方具有清热、抗炎、降压、保肝、改善胃肠道功能及促进学习记忆等作用。近年来黄连解毒汤已被广泛用于治疗脑血管病及脑血管障碍后遗症^[2]。

中枢神经系统中作为神经递质的游离氨基酸分2类,即兴奋性氨基酸(Excitatory amino acid, EAA)和抑制性氨基酸(Inhibitory amino acid, IAA),分别以谷氨酸(Glutamic acid, Glu)和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)为代表。这2类氨基酸通过各自的受体相互作用,在调节中枢兴奋性、维持神经

冲动的正常传递和学习、记忆等脑功能方面具有重要作用。脑缺血损伤后,氨基酸类递质代谢异常可使神经元膜受体异常兴奋,细胞内信息传导系统发生改变。目前氨基酸类神经递质与脑缺血的研究较多集中在脑缺血急性期氨基酸类神经递质的含量变化,较少涉及脑缺血亚急性期氨基酸类神经递质的变化。本研究采用2-巯基乙醇(OPA)-柱前衍生高效液相色谱荧光检测法测定脑缺血7 d后大鼠丘脑中Glu与GABA的含量,分析黄连解毒汤对脑缺血亚急性期大鼠氨基酸类神经递质的影响,为促进脑中风后神经功能康复的治疗提供新的借鉴。

1 材料

1.1 仪器

*药师。研究方向:临床中药学。E-mail: guoxu91425@163.com

1200LC型液相色谱系统仪,包括G1321A型检测器、G1311A型四元泵、G1329A型进样器(美国Agilent公司);5810R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司);VOTEX-5型涡旋器(美国Scientific公司)。

1.2 药品与试剂

黄连解毒汤药材水提物、总生物碱、总黄酮和Glu总环烯醚萜由中国中医科学院中药研究所提供。Glu对照品(批号:205-538-1,纯度:>98%)、GABA对照品(批号:200-258-6,纯度:97%)均源自化合物目录数据库(EINECS);甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠48只,♂,体质量240~260g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[实验动物使用许可证号:SCXK(京)2006-0009]。大鼠饲养在首都医科大学实验动物中心,实验条件下自然饮食,适应环境3d后进行实验。

2 方法与结果

2.1 复制模型

采用大鼠中动脉线栓法^[3-4]制备大鼠永久性脑缺血模型。大鼠ip给予10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,仰卧位固定,常规消毒皮肤,结扎颈总动脉近心端和颈外动脉,将预先处理成圆头的尼龙线(直径0.265 mm)置于颈内动脉18 mm,当感到有轻微阻力感时,扎紧动脉残端,伤口处给予青霉素钠抗感染,缝合皮肤。假手术组大鼠麻醉后,仅暴露颈内外动脉分支,不闭塞大鼠中动脉。术中、术后严格控制室温在24~25℃,大鼠体温维持在36.5~37.5℃。待大鼠麻醉清醒后立即观察其活动状态,术后出现明显左侧偏瘫体征(不能完全伸展左前肢、行走时向左侧倾倒或转圈者)选为实验对象。

2.2 分组与给药

将48只大鼠随机均分为6组,即假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、黄连解毒汤药材水提物(简称水提物,800 g/kg)组、黄连解毒汤药材总生物碱(简称总生物碱,44 mg/kg)组、黄连解毒汤药材总黄酮(简称总黄酮,50 mg/kg)组、黄连解毒汤药材总环烯醚萜(简称总环烯醚萜,80 mg/kg)组。复制模型成功2 h后ig给药,q12 h,连续7 d。以上剂量均为临床剂量按比例计算后的7倍量。

2.3 取材与标本的处理

末次给药1 h后,各组大鼠ip给予10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后,快速断头,低温取丘脑并称重。冰浴中加入95%乙醇匀浆液(1:9, V/V),匀浆;于4℃下,以离心半径12.5 cm、10 000 r/min离心20 min,取上清液100 μl,加入95%乙醇400 μl,稀释为2%样本,涡旋混匀;于4℃下,以离心半径12.5 cm、10 000 r/min离心10 min。取2%样本稀释液上清液50 μl,加入95%乙醇450 μl,稀释为0.2%样本,混匀,-20℃贮藏,备用。

2.4 OPA-柱前衍生高效液相色谱荧光检测法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:KH₂PO₄缓冲液(A,以5 mol/L NaOH调pH至6.5)-甲醇(梯度洗脱程序见表1),流速:1.0 ml/min;荧光检测:激发波长357 nm,发射波长455 nm;柱温:35℃;进样量:10 μl。

2.4.2 衍生化试剂的制备 称取0.02 g OPA,用500 μl甲醇充

分溶解,加入80 μl β-巯基乙醇,再加入0.1 mol/L四硼酸钠溶液4 ml,充分混合后,衍生化24 h,即得到衍生化试剂。将其于棕色瓶、4℃避光贮藏,1周之内有效。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	80	20
11	80	20
12	65	35
27	36	64
28	15	85
30	15	85
31	10	90
40	10	90
41	80	20
50	80	20

取待测对照品溶液或样品液300 μl,加入300 μl 0.05 mol/L NaHCO₃,再加150 μl衍生化试剂,涡旋混匀,反应1 min(即检测前处理)后进样。

2.4.3 系统适用性试验 取空白(缓冲液)、氨基酸对照品、经衍生化反应再检测前处理的样品各10 μl,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果表明,Glu峰在8 min、GABA峰在21 min处出现。色谱图见图1。

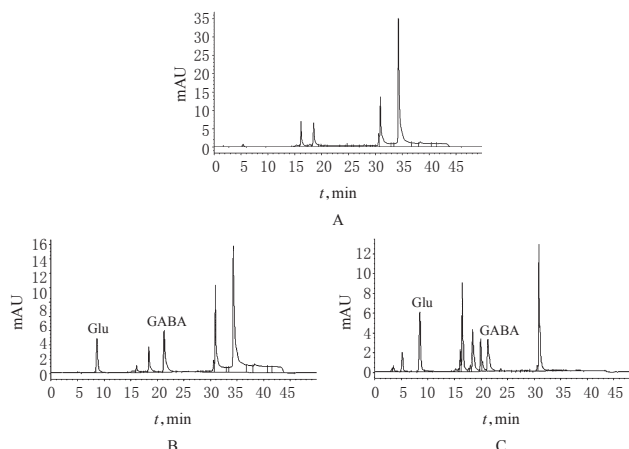


图1 高效液相色谱图

A. 空白; B. 氨基酸对照品; C. 样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank; B. amino acid reference; C. sample

2.4.4 标准曲线的制备 将Glu、GABA对照品溶液(0.05 mmol/L)依次用0.05 mol/L NaHCO₃溶液稀释成浓度均为0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L的梯度溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以峰面积为纵坐标(y)、浓度为横坐标(x, μmol/L)进行线性回归,得Glu、GABA回归方程分别为 $y=7.2426x+7.3190$ ($R^2=0.9909$)、 $y=13.272x+11.056$ ($R^2=0.9996$)。结果表明,Glu、GABA的检测浓度线性范围均为0.625~40 μmol/L。

2.5 样品的测定

分别将各样品色谱中Glu和GABA峰面积代入相应的标准曲线,经计算并换算可求得各样品中Glu和GABA的含量(mmol/L)。所得到的数据用SPSS 16.0软件进行单因素方差

分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.6 各组大鼠丘脑中Glu、GABA含量的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠丘脑中Glu、GABA含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,水提取物组、总生物碱组、总黄酮组、总环烯醚萜组大鼠丘脑中Glu含量增加,总黄酮组大鼠丘脑中GABA含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组大鼠丘脑中Glu、GABA含量的测定结果见表2。

表2 各组大鼠丘脑中Glu、GABA含量的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Determination results of the contents of Glu and GABA in the thalami in all groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Glu, mmol/L	GABA, mmol/L
假手术组	6	11 281.08 ± 2 922.65	5 679.51 ± 2 157.80
模型组	6	7 521.36 ± 2 750.38*	2 927.92 ± 1 191.39**
水提取物组	7	12 134.45 ± 3 822.63 [#]	2 889.37 ± 954.98
总生物碱组	6	9 215.40 ± 1 287.82 [#]	3 062.83 ± 1 234.74
总黄酮组	7	10 680.46 ± 2 426.40 [#]	4 146.88 ± 1 610.62 ^{##}
总环烯醚萜组	6	10 190.33 ± 4 835.97 [#]	3 594.82 ± 1 897.39

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. sham-operation group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3 讨论

大量研究表明,脑缺血急性期组织缺血缺氧后,胞内 Ca^{2+} 浓度异常升高,触发突触末梢,以致Glu大量释放并蓄积、 Na^+-K^+-ATP 酶合成障碍、ATP下降,影响了Glu摄取功能,甚至出现Glu向细胞外液转移的现象,导致突触间隙持续高浓度的Glu,从而引起兴奋性神经毒性^[5]。

大量实验证明,脑缺血急性期脑组织中GABA含量升高。当脑血流量降至阈值时, Na^+-K^+-ATP 酶和转运系统受到抑制,GABA重摄取受抑制;神经元去极化导致神经末梢释放氨基酸类神经递质,使GABA释放增多^[6],此时GABA含量增加可对抗Glu兴奋性毒性作用。

本实验结果发现,模型大鼠丘脑Glu含量较假手术组明显下降。分析原因可能是脑组织受到缺血缺氧的刺激,Glu呈瀑布式释放而递质耗竭,同时能量供应障碍使其生成减少,以及由于神经细胞对Glu的重摄取和灭活能力大为减弱,Glu由神经细胞释放到细胞外间隙继而通过血-脑屏障和脑-脑脊液屏障流入血液及脑脊液,使得Glu含量降低^[7]。

本实验显示,脑缺血7d后大鼠丘脑GABA含量下降。有文献报道,GABA减少会导致内源性抑制减弱、兴奋性异常增强,加重神经元损伤^[8]。缺血急性期GABA大量释放使递质耗竭,过度兴奋后的细胞膜结构和功能尚未恢复,导致前体物质摄取受抑制,GABA合成障碍;此外,脑缺血导致血脑屏障损害,GABA可通过血脑屏障、脑-脑脊液屏障而流入血液和脑脊液中,导致脑组织中GABA含量减少。相关研究表明,随着时间的延长丘脑神经元逐渐变性、死亡,增生的神经胶质细胞将其中以及来源于神经元的GABA经由三羧酸循环进行转化作用,也会在一定程度上使脑组织中GABA含量减少^[9]。

目前研究表明,黄连解毒汤对多种实验性脑缺血损伤都有明确的保护作用。Glu和GABA是一对重要的兴奋性与抑

制性氨基酸神经递质,两者的平衡对脑功能的维持起着重要作用。本实验结果显示,黄连解毒汤药材水提取物组、总生物碱组、总黄酮组、总环烯醚萜组大鼠GABA含量较模型组明显增加,而黄连解毒汤药材总黄酮可促进缺血7d后大鼠丘脑Glu、GABA含量恢复至正常水平。相关研究表明,黄酮类成分有一定的 Ca^{2+} 通道阻滞作用,可以通过阻滞平滑肌细胞膜上的电压依赖性钙通道和受体操纵型钙通道从而抑制胞内 Ca^{2+} 的超载,使兴奋性氨基酸类神经递质的释放减少,抑制性氨基酸类神经递质增多,减少Glu产生的兴奋性毒性作用,同时也通过GABA对抗Glu兴奋性毒性作用,最终促使Glu、GABA含量恢复至正常水平,从而发挥Glu和GABA的生理功能^[10]。此外,黄芩中主要的有效成分黄酮类物质黄芩苷可通过抑制自由基导致的脂质过氧化作用,减轻自由基对脑组织的损伤^[11],与促进脑组织递质氨基酸水平的恢复有一定的相关性。

综上,黄连解毒汤药材总黄酮可促进脑缺血亚急性期大鼠丘脑递质氨基酸含量恢复至正常水平,其作用与黄连解毒汤抗脑缺血、促进脑功能恢复关系密切,值得深入研究。

参考文献

- [1] 李俊行,祖金祥,刘树民,等.配伍前后黄连解毒汤中4种有效成分含量的对比研究[J].中国药房,2011,22(23):2153.
- [2] 徐静华,于庆海,蔡爽,等.黄连解毒汤对小鼠急性脑缺血、缺氧的影响[J].沈阳药科大学学报,2003,20(2):132.
- [3] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84.
- [4] 汪晖,吴基良.药理学实验[M].武汉:湖北科学技术出版社,2002:153.
- [5] 刘杰,华赞鹏,谭敏谊,等.芍药苷注射液对脑缺血-再灌注沙土鼠脑组织中兴奋性氨基酸及腺苷含量的影响[J].中药材,2010,33(9):1456.
- [6] 石会娟,梁起保,薛茜,等.康脑液对脑缺血再灌注损伤大鼠血清及脑组织中氨基酸含量的影响[J].天津医药,2011,39(10):939.
- [7] 邓世芳,蒋红玉,张思为,等.芪棱汤对大鼠脑缺血再灌注后兴奋性氨基酸的影响[J].中国中医急症,2011,20(4):585.
- [8] 刘可云,黄贤珍.厚朴酚对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用与 γ -氨基丁酸的关系[J].时珍国医国药,2006,17(6):971.
- [9] 陈晓晴,向赞,罗小平.慢性脑缺血对大鼠丘脑神经代谢物质的影响[J].解剖学研究,2008,30(2):101.
- [10] 史亚军,施俊辉,陈世彬,等.黄芩苷治疗缺血性脑损伤研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):218.
- [11] 胡秀梅.黄芩苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].山西医科大学学报,2010,41(2):100.

(收稿日期:2014-08-05 修回日期:2014-10-20)

(编辑:张静)