

提取工艺对脑得生抗大鼠局灶性脑梗死的影响

欧来良¹, 李家政²; 王瑞芳¹, 史作清¹, 施荣富¹

(1. 南开大学 生物活性材料教育部重点实验室, 分子生物学研究所, 天津 300071;

2. 天津大学高分子材料研究所, 天津 300072)

摘要:目的 通过对脑得生不同提取工艺——分煎与合煎抗大鼠局灶性脑梗死影响的实验研究, 探索中药复方分煎工艺在中药现代化进程中实施的可能性。方法 利用 FeCl₃ 损伤血管制作大鼠大脑中动脉血栓模型, 于血栓形成后 5 d 内, 给药组连续 ig 脑得生按药典法制备制剂 (N1, 1.2 g/kg)、脑得生各单味药分煎, 吸附树脂富集、分离有效部位混合制剂 (N2, 0.2 g/kg) 和脑得生各单味药合煎, 吸附树脂富集、分离, 有效部位混合制剂 (N3, 0.6 g/kg), 观察大鼠行为评分、脑梗死面积及病理组织学变化。结果 经 N1、N2 和 N3 治疗的大脑中动脉血栓模型大鼠的行为评分、脑组织梗死面积与模型组相比差异均有显著性 ($P < 0.01$), 组织病理变化较模型组也有明显改善。而 N1、N2 和 N3 组间相比差异无统计学意义。结论 采用单味药有效成分或部位分别提取, 而后组方所得复方制剂, 并不会降低原方的整体疗效发挥。该研究结果对其他复方研究也具有一定的推广价值。

关键词: 脑得生; 提取工艺; 脑梗死

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0393-03

Effects of different extracting techniques on Naodesheng against focal cerebral infarction of rats

OU Lai-liang¹, LI Jia-zheng², WANG Rui-fang¹, SHI Zuo-qing¹, SHI Rong-fu¹

(1. The Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Institute of Polymer Materials, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of the individual decocting and codecocting techniques for compound herbal medicine in the course of Chinese materia medica (CMM) modernization through studies on the effect of Naodesheng various preparations on the focal cerebral infarction of rats. **Methods** The cerebral artery thrombosis model was made by FeCl₃-induced damage to local cerebral middle artery of rats. Within five days since thrombogenesis, the behavioral score of neurological deficit was evaluated and the size of cerebral infarction was measured after the rats were fed by continuously ig Naodesheng I (N1, 1.2 g/kg), prepared according to *Pharmacopeia*, Naodesheng II (N2, 0.2 g/kg) prepared by decocting single herbs respectively, then mixing their fractions together, and Naodesheng III (N3, 0.6 g/kg) prepared by codecocting herbs together, then isolating their effective ingredients. Also the histopathological changes were examined. **Results** Both the behavioral score of neurological deficit and the size of cerebral infarction in the treatment groups were significantly diminished as compared to the control group ($P < 0.01$) and histopathological group showed significant changes compared to the model group. While among the N1, N2, and N3 groups there was no statistically significance in terms of the above-mentioned parameters. **Conclusion** The results demonstrate that the curative effect of the individual decocting technique of compound herbal medicine is not difference from that of codecocting technique. Therefore, the individual extraction technique could be applied to compound CMM in order to reduce the difficulty in extraction, separation, analysis and so on.

Key words: Naodesheng; extracting technique; cerebral infarction

如何实现中药复方的现代化, 长期以来一直困扰着广大医药工作者。目前阻碍中药现代化进程的关键问题是如何对中药有效成分或部位提取分离和

分析定量。众所周知, 中药的成分非常复杂, 复方更似一个庞大的天然组合化学库, 如何在如此复杂庞大的体系内确定目标成分并对确定目标成分进行定

收稿日期: 2004-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29974015)

作者简介: 欧来良 (1972—), 男, 博士, 主要从事功能高分子合成和中药现代化研发。

Tel: (022) 23500660 E-mail: ouyll001@eyou.com

量分析,令许多药理学工作者望而却步。笔者认为,解决上述问题的首要步骤是必须对中药复方体系进行肢解,即实施复方中各单味中药的分别提取、分离、分析,这样将可大大简化复方现代化的工作难度。但这种做法(分煎)似乎与传统的中药煎煮法(合煎)有所背离,是否会降低中药复方的疗效也一直众说纷纭。本实验选用《中华人民共和国药典》(药典)中对缺血性脑中风及中风后遗症具有明确疗效的复方中药——脑得生为研究对象,通过分煎、合煎两种不同提取工艺获得提取物,并对不同制剂治疗大鼠局灶性脑梗死的疗效进行了系统研究,以探讨分煎工艺在中药复方现代化过程中实施的可行性。

1 材料

1.1 药品与试剂:三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen、川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.、红花 *Carthamus tinctorius* L.、葛根 *Pueraria thomsonii* Benth.、山楂 *Crataegus pinnatifida* Bunge (去核)由河北省安国市医药公司提供(经安国市医药公司鉴定符合药典标准);红四氮唑(分析纯)为北京市朝阳区八里庄化工厂生产;10%福尔马林为中国华东师范大学化工厂生产;水合氯醛为北京市朝阳区八里庄化工厂生产;HE试剂均由日本精株会社生产;吸附树脂,欧瑞生物科技公司研制。

1.2 动物:Wistar大鼠,雄性,体重230~260g,二级动物,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

2 方法

2.1 供试药品的制备

2.1.1 脑得生制剂Ⅰ(N1)的制备:按2000年版药典中所述比例称取一定量药材,并按药典方法制备。

2.1.2 脑得生制剂Ⅱ(N2)的制备:同上按比例取三七、川芎、红花、葛根、山楂(去核)一定量,然后将各味中药分别提取,用大孔吸附树脂对各药中的有效部位进行富集、分离,再将各单味药有效部位提取物混合,制得N2。

2.1.3 脑得生制剂Ⅲ(N3)的制备:同上按比例取三七、川芎、红花、葛根、山楂(去核)一定量,然后将各味中药分别提取,用大孔吸附树脂对各味药中的有效部位进行富集、分离,制得N3。

2.2 脑梗死动物模型的制备:选取健康成年雄性大鼠,体重230~260g,水合氯醛ip麻醉,左侧卧位固定,右侧脸部剃毛,局部以酒精棉球消毒,于亚细菌手术条件下,经眼外眦与外耳道连线间开口约1.5cm,分离颞肌,剪断颞骨,固定窗口,按Tamura等方法颅骨底处开颅窗^[1,2],暴露右侧位于嗅束及大脑

下静脉之间的一段大脑中动脉,置一块滤纸(2mm×3mm)敷于中动脉处,将10μL 50% FeCl₃滴于滤纸片上,30min后取出滤纸片,用生理盐水清洗创面,滴入青霉素钠注射液0.2mL (2.0×10⁵ U/mL)预防感染,逐层缝合创面,碘酒消毒,回笼饲养待用。

2.3 实验分组及给药方案:将手术24h后的大鼠按文献评分方法^[3]评定行为障碍程度,根据分数高低均分为5组,每组15只,其中10只进行行为学与梗死面积的观察,另外5只进行病理组织学观察。假手术组(未阻断大脑中动脉)、模型对照组均给予蒸馏水;N1组1.2g/kg, N2组0.2g/kg, N3组0.6g/kg;每天定时ig给药1次,给药后1h进行行为学评分^[3]。连续观察5d,观察药物作用效果。各组大鼠行阻断大脑中动脉术后24h及每天给药后1h按照评分标准进行运动、肌张力等神经功能损害程度评分。

2.4 梗死范围测量:在末次给药1h后,水合氯醛麻醉,断头取脑,置生理盐水中,放入冰箱冷冻60min后取出,去掉嗅脑、小脑和低位脑干,将每个大脑组织切成5片,厚度约2mm,以4%红四氮唑(TTC)染色,37℃水浴20min后取出。10%福尔马林固定24h后,根据重量法计算梗死部分质量占全脑组织质量的百分比,作为梗死范围的指标。

2.5 病理学检查:将各组大鼠脑组织标本10%中性福尔马林固定、脱水、石蜡包埋、常规制片、HE染色,光镜下进行组织形态学观察。

2.6 统计方法:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间行 t 检验。

3 结果

3.1 N1、N2和N3药效部位的定量分析:结果见表1。N1是采用2000年版药典标准提取所得制剂,其所含成分繁多,给分析定量带来一定的困难,而且有效成分含量较低;N2制剂是针对药物特点,选择合适的溶剂提取,经相应的大孔吸附树脂纯化后,所得各单味中药有效部位提取物的混合物,其有效成分含量较高(注:表1中N2制剂各成分含量,为单味提取物按比例混合后,根据单味提取物的量换算所得),且容易定量分析;N3则是混合煎煮后,经相应的大孔吸附树脂纯化后所得制剂。

3.2 大鼠脑梗死后行为的动态变化及N1、N2和N3的影响:经过阻断大脑中动脉手术的大鼠麻醉清醒后即有偏瘫症状的出现。主要表现为不同程度的手术对侧前肢内收,肩内旋,肌张力降低,抵抗阻力降低,甚至有些动物出现不停地向一侧转圈。从

表 1 N1、N2 和 N3 有效成分分析

Table 1 Effective ingredients in N1, N2, and N3

制剂	总皂苷/%	总黄酮/%	川芎嗪/%	阿魏酸/%
N1	0.62	0.82	—	—
N2	14.6	63.3	0.05	0.21
N3	26.1	4.1	—	—

表 2 N1、N2 和 N3 对大鼠大脑中动脉栓塞后行为评分及梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of N1, N2, and N3 on behavioral score and infarction area of rats after middle cerebral artery thrombosis ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	给药前评分	给药后评分					梗死面积/%
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
假手术	—	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型	—	7.2±1.0	7.2±1.0	7.1±1.3	6.9±1.2	6.6±1.0	6.8±0.9	8.10±1.95
N1	1.2	6.9±0.9	5.8±1.2*	4.7±1.3**	3.9±0.9**	3.2±1.1**	2.9±1.4**	4.30±2.84**
N2	0.2	7.0±0.8	6.4±1.3	5.3±1.6*	4.4±1.8**	4.1±1.7**	3.1±1.6**	5.50±2.36**
N3	0.6	7.2±0.6	6.8±0.9	5.8±1.5*	4.6±1.9**	4.1±1.7**	3.5±1.3**	4.85±2.84

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

3.3 大鼠脑梗死形成后脑梗死范围的观察及 N1、N2 和 N3 的影响:见表 2。血栓形成术后 5 d 大鼠脑组织梗死程度明显。在给予 N1、N2 和 N3 治疗后,脑梗死面积百分比均有所下降,与模型组相比差异均有显著性,而 N1、N2 与 N3 相互比较对脑梗死面积的影响差异不显著。

3.4 大鼠脑血栓形成后组织形态学变化及 N1、N2 和 N3 的影响:大鼠经脑梗死术后 5 d,解剖后肉眼可见各组大鼠脑梗死区组织肿胀、质地变软、色泽灰暗,部分组织液化。在光学显微镜下观察可见模型组大鼠脑梗死部位出现缺血性病变,皮质坏死,神经细胞肿胀,尼氏小体溶解消失,神经胶质细胞核染色变深,固缩,轮廓不清,梗死区片状液化坏死、出血,可见中性白细胞和巨噬细胞浸润,纤维母细胞及胶质细胞增生,可见噬细胞现象。假手术组无明显病理改变。N1、N2 和 N3 治疗后的大鼠,脑组织切片显示,大脑梗死部位皮质坏死区较小,部分神经胶质细胞核固缩、染色变深,尼氏小体部分消失,梗死出血灶均较模型组轻。

4 讨论

4.1 本实验结果表明:脑得生制剂对大鼠局灶性脑缺血具有良好的治疗作用,制备工艺的不同对脑得生发挥治疗作用的影响不大。因此本研究认为,就复方脑得生的现代化开发而言,可以采用单味药有效成分或部位分别提取、定量而后组方的方法代替传统“一锅煮”,这样就可以大大降低复方脑得生中有效成分或部位分离和定量的复杂性,加快现代化复方中药——脑得生的产生进程。

表 2 可以看出,模型组术后 1 d 的行为评分和术后各天评分无明显变化,第 2 天后行为有缓和恢复趋势。术后给予 N1、N2 和 N3 的大鼠,2 d 后其行为变化与模型对照组相比有明显改善 ($P<0.01$),而 N1 和 N2 两组间相比差别无统计学意义。假手术组的动物行为无明显改变。

4.2 复方中药的化学成分非常复杂,但若按有效部位划分大致可分为黄酮类、皂苷类、生物碱类、有机酸类、挥发油类、树脂、多糖等 10 余类,其中又以黄酮类、皂苷类、生物碱类、有机酸类、挥发油类为中药发挥药效的主要活性成分,本研究所选用的复方脑得生虽然药味不多,但却几乎涵盖了中药有效部位的所有主要类别,如三七含有皂苷类、黄酮类、多糖类等;山楂含有有机酸(枸橼酸)、黄酮类等;川芎含有挥发油类(藁本内酯等)、生物碱类(川芎嗪等)、有机酸类(阿魏酸等)等。因此以脑得生为研究对象,所取得的成果是具有一定的代表性和推广价值的。

4.3 对研究结果初步分析认为,对脑得生制剂分煎与合煎具有基本相同的药理作用,也说明两种工艺发挥药理作用的物质基础基本是一致的,合煎时各种中药的成分之间尽管可能发生助溶、结合、成盐等物理和化学反应,产生一些新的物质,但这些新物质在人体内酸、碱、酶的作用下,也可能被还原为原生物质以发挥药效。对其药效物质基础的深入研究正在进行中。

References:

[1] Tamura A, Graham D I, Macculloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 1981(1): 53-57.
[2] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17: 472-477.
[3] Liu X G, Xu L N. 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.