

冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障转运蛋白的影响

唐 三, 丁 煌[#], 杨筱倩, 陈仙蕾, 黄小平*, 邓常清*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 中西医结合心脑血管病防治湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 从血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)转运蛋白角度探讨冰片配伍黄芪甲苷(astragalosides IV, AST IV)和三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)在脑缺血再灌注状态下促进药物成分入脑的作用。方法 采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, ig 给予冰片、AST IV、PNS 及其配伍药物, 2,3,5-氯化三苯四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色法测定脑组织损伤, Western blotting 法检测脑组织外排蛋白 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和多药耐药相关蛋白 1(multidrug resistance protein-1, MRP-1)、MRP-2、MRP-4、MRP-5 及摄取蛋白有机阳离子转运体 3(organic cation transporter 3, OCT3)、有机阴离子转运多肽-2(organicanion transporting polypeptides-2, OATP-2)蛋白的表达, real-time PCR 法检测脑组织多药耐药(multidrug resistance, mdr)基因 mdr1a、mdr1b 和 mrp-1、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA 表达。结果 TTC 染色结果显示, 脑缺血再灌注后, 大鼠脑组织出现明显梗死灶。各药物能显著减少脑梗死体积, AST IV+PNS 的效应强于 AST IV 与 PNS 单用, 冰片+AST IV+PNS 的效应强于各药物单用及 AST IV+PNS。外排蛋白和基因检测显示, 脑缺血再灌注后, 大鼠脑组织 P-gp、MRP-1、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达均显著增多。与模型组比较, 冰片能显著下调大鼠脑组织 P-gp、MRP-2、MRP-4 蛋白表达水平, PNS 能显著下调 MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平, AST IV、AST IV+PNS 与冰片+AST IV+PNS 能显著下调 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平, 且冰片+AST IV+PNS 的效应显著强于各药物单用及 AST IV+PNS, AST IV+PNS 的效应显著强于 AST IV 或 PNS 单用。基因表达结果与蛋白表达结果类似。摄取蛋白检测结果显示, 与对照组比较, 脑缺血再灌注后大鼠脑组织 OCT-3 蛋白表达在模型组及各给药组变化均不明显, 而模型组 OATP-2 蛋白表达水平显著降低。PNS、AST IV+PNS 及冰片+AST IV+PNS 能显著上调 OATP-2 蛋白表达水平, 且 AST IV+PNS 的效应显著强于 AST IV、PNS 单用, 冰片+AST IV+PNS 的效应显著强于各药物单用及 AST IV+PNS。结论 脑缺血再灌注后, 脑组织损伤, BBB 的主要外排蛋白和基因表达均显著增强, 而摄取蛋白 OATP-2 表达显著降低。冰片配伍 AST IV 及 PNS 后, 能增强抗缺血性脑损伤的作用, 其作用可能与下调 BBB 中外排蛋白 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 和相应基因表达, 同时上调摄取蛋白 OATP-2 表达, 促使脑组织中冰片、AST IV 及 PNS 有效成分的吸收与富集而发挥药理作用有关。

关键词: 冰片; 黄芪甲苷; 三七总皂苷; 脑缺血再灌注; 血脑屏障; 转运蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4389-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.019

Effect of borneol combined with astragaloside IV and *Panax notoginseng* saponins on transporter proteins of blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion

TANG San, DING Huang, YANG Xiao-qian, CHEN Xian-lei, HUANG Xiao-ping, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-Cerebral Diseases, Key Laboratory of Hunan Universities for Cell Biology and Molecular Techniques, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 湖南中医药大学“十三五”一级学科基础医学建设项目(No: 06); 国家自然科学基金资助项目(81573875); 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划-中医脑病临床研究中心(2017SK4005); 2017 年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(1029); 湖南省自然科学基金创新群体基金“中医药防治心脑血管疾病基础研究”

作者简介: 唐 三(1994—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。

Tel: (0731)88458710 E-mail: 439435471@qq.com

***通信作者** 黄小平(1974—), 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。

Tel: (0731)88458013 E-mail: 569229858@qq.com

邓常清(1963—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。

Tel: (0731)88458710 E-mail: dchangq@sohu.com

#并列第一作者 丁 煌(1990—), 女, 助理实验师, 主要研究方向为心脑血管疾病的中药药理研究。

Tel: (0731)88458710 E-mail: 287351273@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effects of borneol combined with astragaloside IV (AST IV) and *Panax notoginseng* saponins (PNS) on promoting the active components into the brain and anti-brain injury through the regulation of transporter proteins of blood-brain barrier (BBB) in the state of cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** Focal cerebral ischemia-reperfusion model in rats was established, borneol, AST IV, PNS and the combination were administered by gavage, brain infarction rate was evaluated by 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining, the expressions of efflux proteins such as p-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance protein (MRP)-1, MRP-2, MRP-4, MRP-5 and uptake proteins such as organic cation transporter (OCT)-3, organic anion transporting polypeptides (OATP)-2 in brain tissues were detected by Western blotting. The expressions of multidrug resistance (MDR) such as *mdr1a*, *mdr1b* and *mrp-1*, *mrp-2*, *mrp-4*, *mrp-5* mRNA in brain tissues were determined by real-time PCR method. **Results** The results of TTC staining showed that brain infarct was found after cerebral ischemia-reperfusion. Each drug could significantly reduce brain infarction volume and decrease infarction rate, and the effect of AST IV + PNS was better than that of AST IV and PNS alone, the effect of borneol + AST IV + PNS was better than that of single drug and AST IV + PNS. The results of major efflux proteins and genes detection showed that the protein expressions of P-gp, MRP-1, MRP-2, MRP-4, and MRP-5 were significantly increased in rats after cerebral ischemia-reperfusion. Borneol could significantly down-regulate the expressions of P-gp, MRP-2, MRP-4 proteins, PNS could significantly down-regulate the levels of MRP-4, MRP-5 proteins; AST IV, AST IV + PNS and borneol + AST IV + PNS could significantly down-regulate P-gp, MRP-2, MRP-4, MRP-5 proteins, and the effects of borneol + AST IV + PNS were significantly better than those of single drug and AST IV + PNS; The effects of AST IV + PNS were significantly better than those of AST IV or PNS alone. The results of gene expressions were similar to those of protein expression. The results of major uptake proteins showed that the expression of OCT-3 protein did not change significantly in the model group and drug groups after cerebral ischemia-reperfusion; However, the expression of OATP-2 protein was significantly decreased in the model group. PNS, AST IV + PNS and borneol + AST IV + PNS could significantly up-regulate the expression of OATP-2 protein; Furthermore, the effect of borneol + AST IV + PNS was significantly greater than that of single drug and AST IV + PNS, and the effect of AST IV + PNS was significantly greater than that of AST IV and PNS alone. **Conclusion** After cerebral ischemia-reperfusion, brain tissues were damaged, the expressions of major efflux proteins and genes on BBB were significantly increased, while the expression of uptake protein such as OATP-2 was significantly decreased. Borneol combined with AST IV and PNS can enhance the effect of anti-ischemic brain injury, which may be related to the down-regulations of the expressions of efflux proteins such as P-gp, MRP-2, MRP-4, MRP-5 and corresponding genes in BBB, as well as the up-regulation of the expression of uptake proteins such as OATP-2, thus promoting the absorption and the enrichment of borneol, AST IV and the effective components of PNS in brain tissues, playing a better role in pharmacology.

Key words: borneol; astragaloside IV; *Panax notoginseng* saponins; cerebral ischemia-reperfusion; blood-brain barrier; transporter proteins

血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 和血液的分界面, 是维持脑内环境稳定的重要结构。生理状态下, 一方面它允许血液中脑组织所需要的营养物质等通过; 另一方面能阻挡有害物质的侵入, 将有害物质和代谢产物排出, 从而维持脑内环境的稳定。但也由于 BBB 的存在, 药物无法或难以穿过 BBB, 在脑内浓度较低, 不能充分发挥作用, 成为 CNS 药物治疗的瓶颈。

BBB 依赖特殊的血管内皮结构及转运蛋白来发挥屏障功能, 这些转运蛋白负责识别和外排有害物质并吸收有益物质, 根据转运方式, 可分为外排蛋白和摄取蛋白。ATP 结合盒 (ATP-binding cassette transporter, ABC) 转运体是 BBB 最重要的脂溶性分子外排转运体, 可减少药物在脑组织中的蓄积^[1]。目前研究较多的 ABC 转运体有 P-糖蛋白 (P-

glycoprotein, P-gp) 和多药耐药蛋白 (multidrug resistance protein, MRP), 在体内广泛分布在小肠、肝脏、肾脏、胎盘、脑及各类屏障 (如血-脑屏障、血-脑脊液屏障、血-胎盘屏障) 等部位^[2]。摄取蛋白包括有机阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptides, OATPs)、有机阴离子转运体 (organic anion transporters, OAT)、有机阳离子转运体 (organic cation transporter, OCT) 和单羧酸转运体 (monocarboxylate transporter, MCT), BBB 负责将 CNS 外的这些有机阴/阳离子, 以载体介导的方式转入 CNS^[3]。

大量临床研究表明, 脑梗死的基本病机是气虚血瘀, 治疗应当益气活血。黄芪和三七是治疗心脑血管疾病的常用有效中药, 黄芪具有补气之功效, 三七具有活血化瘀作用, 二者配伍具有益气活血的作用, 临床常配伍使用。研究表明, 黄芪总苷

(astragaloside, AST) 是黄芪中具有心脑血管效应的主要药效组分, 主要含黄芪甲苷 (astragalosides IV, AST IV)。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是三七中具有心脑血管效应的主要药效组分, 主要含人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 和三七皂苷 R₁。前期研究发现 AST IV 和 PNS 主要有效成分配伍可从多环节、多靶点发挥抗缺血性脑损伤的作用^[4-8], 但 AST IV 和 PNS 的主要成分由于其相对分子质量大、脂溶性低, 透过 BBB 的量少, 难以更好地在病变脑组织发挥药理作用^[9-11]。

冰片是小分子脂溶性单萜类化合物, 为龙脑香科植物龙脑香 *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. 树脂加工品或菊科植物艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 的鲜叶加工品, 因其“独行则势弱, 佐使则有功”(《本草衍义》), 加之其“芳香走窜”“引药上行”, 故常作为辅药或引经药使用以促进药物吸收及进入病变部位^[12]。前期研究将冰片与 AST IV 和 PNS 配伍, 发现配伍冰片后可促进 AST IV、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和三七皂苷 R₁ 吸收入脑, 增加脑组织药物成分的富集^[13], 但机制尚不清楚。研究^[14]表明, 冰片促进药物吸收入脑的作用, 可能与抑制 P-gp 的外排作用有关, 因而, 推测冰片与 AST IV、PNS 配伍促进药物成分透过 BBB 也可能与 BBB 上的药物转运蛋白有关。本研究主要以相关转运蛋白为靶点探讨冰片促进 AST IV 和 PNS 主要成分入脑的机制, 为后期研究和临床应用奠定理论基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

冰片 (左旋龙脑, 主要成分为 1,7-三甲基-二环庚-2-醇, 质量分数 86%, 批号 20170815) 购自湖北俊辉有限公司; AST IV (质量分数 ≥ 98%, 批号 MUST-17022804); PNS (质量分数 ≥ 98%, 批号 MUST-17060601)、人参皂苷 Rg₁ (质量分数 ≥ 98%, 批号 MUST-17030829)、人参皂苷 Rb₁ (质量分数 ≥ 98%, 批号 MUST-17022510) 和三七皂苷 R₁ (质量分数 ≥ 98%, 批号 MUST-17071228) 对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司; 依达拉奉注射液 (3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5 酮), 购自南京先声东元制药有限公司, 批号 80-090104, 规格 10 mg/支 (5 mL), 药物用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠配制相应质量浓度混悬液。

P-gp 兔单克隆抗体、MRP-1 小鼠单克隆抗体、MRP-2 兔多克隆抗体、MRP-4 兔多克隆抗体、

MRP-5 兔多克隆抗体、OCT3 兔多克隆抗体、OATP2 兔多克隆抗体均为英国 Abcam 公司产品; β-actin 兔多克隆抗体, 美国 ABclonal 公司; HRP 标记的山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗, 美国 Proteintech 公司; 引物由金斯瑞生物科技有限公司合成; Trizol、逆转录试剂盒, 美国 Thermo Fisher 公司; Syber green mix, 近岸蛋白质科技有限公司; RIPA 裂解液, 康为世纪生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂混合物、磷酸酶抑制剂, 瑞士 Roche 集团; ECL 化学发光液, 北京鼎国昌盛生物科技有限公司; 蛋白 Marker, 美国 Thermo Fisher 公司; BCA 试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC), 美国 Sigma 公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证号 43004700037715, 饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 许可证号 SKY (湘) 2013-0005, 实验前适应性喂养 5~7 d, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

1.3 仪器

电泳仪、蛋白转膜槽、ChemiDoc XRS⁺ 化学发光凝胶成像仪、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪, 美国 Bio-Rad 公司; A17052170 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司。

2 方法

2.1 大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) /再灌注模型制备

采用改良 Longa 法^[15]制作 MCAO 局灶性脑缺血模型大鼠。用 10% 水合氯醛 (0.35 g/kg) ip 麻醉, 于颈前正中位置备皮、消毒, 切开 3 cm 左右切口, 钝性分离右侧颈总动脉 (common carotid arteries, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA), 用 5~0 手术线分别结扎 ECA 的远心端并于结扎点近侧凝断 ECA 及其分支, 并对 ICA 远心端进行活结结扎; 予动脉夹夹闭 ICA 远心端与 CCA, 以直径 0.28 mm 的尼龙线线栓自 ECA 经 CCA 与 ICA 分叉部插入 ICA, 松开 ICA 上的动脉夹, 并将线栓插入 ICA 颅内段, 插入长度为 (18±2) mm, 到达大脑中动脉环, 扎住 ICA 内的线栓以防止出血和线栓移动。逐层缝合颈部皮肤。阻断 2 h 后, 拔出线栓进行再灌注 22 h。假手术组仅将 CCA、ECA、ICA 游离

出来,不做结扎、插线处理,其他操作同模型组。

2.2 分组与给药

根据前期实验结果^[16],将大鼠随机分为假手术组、模型组、冰片(15 mg/kg)组、AST IV(20 mg/kg)组、PNS(50 mg/kg)组、AST IV+PNS(20 mg/kg+50 mg/kg)组、冰片+AST IV+PNS(15 mg/kg+20 mg/kg+50 mg/kg)组,及阳性药物依达拉奉(4 mg/kg)组,每组5只。各给药组于造模前2 d开始ig给药,每天2次,给药间隔12 h。依达拉奉组大鼠ip给药,每天1次。假手术组及模型组大鼠ig等量0.5%羧甲基纤维素钠。于给药第3天给药1 h后行缺血2 h再灌注22 h,术后继续同前给药,再灌注结束后处死动物,取患侧脑组织做相应指标检测。

2.3 脑梗死率测定(TTC染色)

麻醉处死大鼠,迅速取脑。置-20℃冰箱15 min,去除小脑、脑干等,沿冠状面将脑组织连续切片5片,每片厚2 mm,立即将切片放入2% TTC磷酸缓冲液中,置37℃水浴避光染色20 min,每5 min将脑片轻轻翻动1次。染色后置于4%多聚甲醛溶液中固定。24 h后将每片脑组织拍照记录。正常脑组织染色为玫瑰红色,梗死灶为苍白色。用Image-pro plus 6.0图像分析软件测量梗死灶面积。根据公式 $V=t(A_1+A_2+\cdots+A_n)$ 计算梗死灶体积,其中 t 为切片厚度, A 为梗死面积($n=5$)。再进一步计算梗死灶体积占全脑体积的百分比即为脑梗死率。

2.4 Western blotting法测定缺血脑组织P-gp、MRP-1、MRP-2、MRP-4、MRP-5、OATP-2、OCT-3蛋白表达

取大鼠患侧视交叉后2~6 mm脑组织50 mg,加入1 mL预冷的RIPA(10 μL磷酸酶抑制剂、1 μL蛋白酶抑制剂),剪碎组织,置玻璃匀浆器冰上匀浆

30~50次,充分混匀静置20 min后12 000 r/min、4℃离心10 min,取上清,BCA试剂盒测定总蛋白量。每个样本取80 μg蛋白,100℃水浴10 min变性后,于110 V恒压电泳90 min,200 mA转膜2 h,5%脱脂牛奶封闭1 h,再分别与P-gp单克隆抗体(1:2 000)、MRP-1单克隆抗体(1:500)、MRP-2多克隆抗体(1:500)、MRP-4多克隆抗体(1:1 000)、MRP5多克隆抗体(1:1 000)、OCT-3多克隆抗体(1:500)、OATP-2多克隆抗体(1:5 000)、β-actin多克隆抗体(1:8 000)孵育,4℃静置过夜,TBST洗3次,每次10 min;然后分别加羊抗兔二抗(1:5 000)或羊抗小鼠二抗(1:8 000),于37℃孵育1 h后,TBST洗膜3次,每次10 min,加ECL化学发光剂于凝胶成像仪中显影。用Image Lab图像分析软件测定蛋白相对表达量。

2.5 qRT-PCR法测定缺血脑组织多药耐药(multidrug resistance, mdr)基因mdr1a、mdr1b与mrp-1、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA表达

取患侧视交叉后2~6 mm脑组织30 mg,Trizol液提取总RNA,检测纯度。以RNA按照试剂盒说明书逆转录成cDNA,以此为模板进行PCR扩增,各基因引物序列见表1。反应体系总体积20 μL,SYBR Green qPCR Super Mix-UDG 10 μL,上、下游引物各1 μL(浓度均为10 μmol/L),cDNA 1 μL,补水至20 μL。扩增程序:95℃、3 min,95℃、15 s,58℃、30 s,共39个循环,65℃、5 s,95℃、5 s。4℃保存。各孔设置2个复孔,分析各孔的 C_t 阈值。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算RNA的相对表达量。每个样本重复3次,以验证结果的可靠性。

2.6 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析。各组计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用LSD检验,方差

表1 mdr1a、mdr1b与mrp-1、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA引物序列
Table 1 Primer sequences of mdr1a, mdr1b and mrp-1, mrp-2, mrp-4, and mrp-5 mRNA

基因	上游序列	下游序列	片段长度/bp
mdr1a	5'-TTTGACTCGGGAGCAGAAGT-3'	5'-AAACCGGAAACAAGCAGCAT-3'	151
mdr1b	5'-ACTCGGGAGCAGAAGTTTGA-3'	5'-AGTTCTCGTGCCACCAAGTA-3'	173
mrp-1	5'-CTGCATTGTGCTGTTTGCTG-3'	5'-ACACAGAGAGACCCACCAAG-3'	80
mrp-2	5'-CGAGAGAGGCTGACCATCAT-3'	5'-TCACCACCCTCTGTCACTTC-3'	185
mrp-4	5'-AGGACTTGCAATCAGAGGCT-3'	5'-GGCAACGACGATGACAAAGA-3'	101
mrp-5	5'-TGTGCAGTTAACCGGACTCT-3'	5'-GTGAACCGTGCTTCTGTCTC-3'	66
GAPDH	5'-GAGACCTTCAACCCCCAGC-3'	5'-CCACAGGATTCCATACCCAA-3'	446

不齐者用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠脑梗死率

TTC 染色结果表明,假手术组大鼠无梗死灶形成,脑梗死率为 0。与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死率显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,各药物组大鼠脑梗死率均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),且 AST IV+PNS 配伍组的效应强于 AST IV、PNS 组 ($P<0.05$ 、 0.01),3 种药物配伍效应强于各药物单用及 AST IV+PNS ($P<0.05$ 、 0.01),见图 1、2。

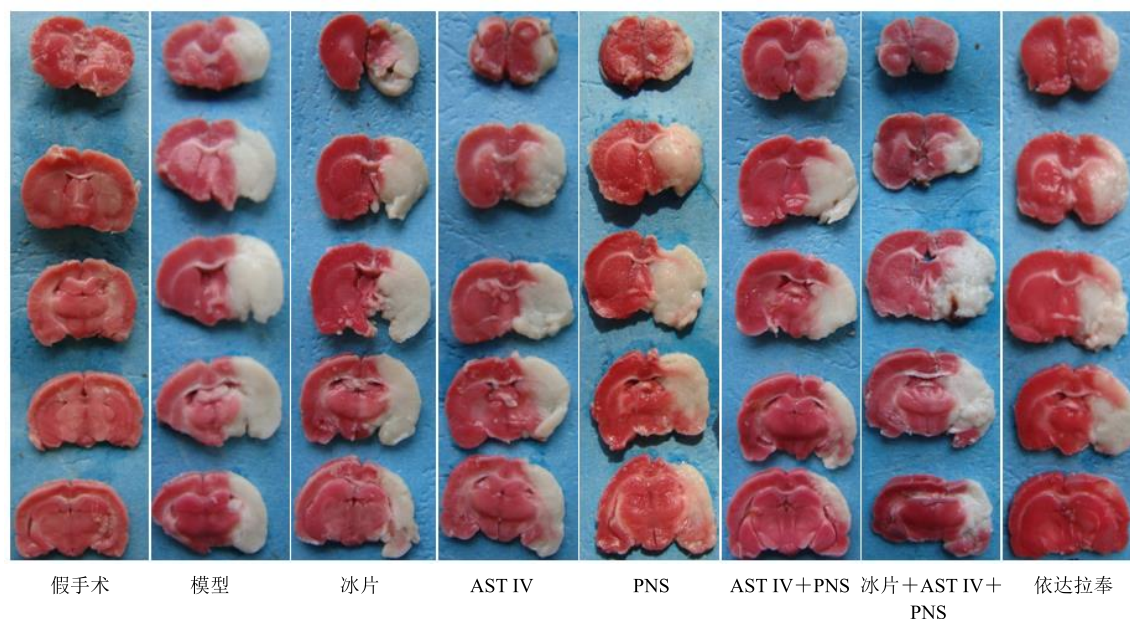
3.2 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织外排蛋白表达的影响

结果(图 3 和表 2)显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 P-gp、MRP-1、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,冰片组大鼠脑组织 P-gp、MRP-2、MRP-4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);AST IV 组、AST IV+PNS 组与冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);PNS 组大鼠脑组织 MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);各给药组大鼠 MRP-1 蛋白表达水平差异不显著;依达拉奉对各外排蛋白的上调均有抑制作用

($P<0.01$)。各给药组间比较,冰片+AST IV+PNS 对 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达下调的作用均显著强于冰片、AST IV、PNS 及 AST IV+PNS ($P<0.05$ 、 0.01);AST IV+PNS 对 P-gp、MRP-4、MRP-5 蛋白表达下调的作用显著强于 AST IV 及 PNS ($P<0.05$),对 MRP-2 蛋白表达下调的作用显著强于 PNS ($P<0.05$)。

3.3 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织外排蛋白 mRNA 表达的影响

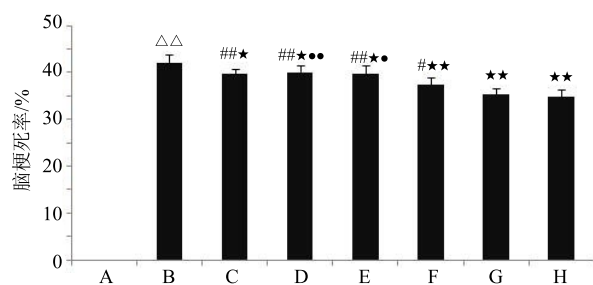
表 3 结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 mdrla、mdrlb、mrp-1、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,冰片组和依达拉奉组大鼠脑组织 mdrla、mdrlb、mrp-1、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);AST IV 组、AST IV+PNS 组与冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织 mdrlb、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01),且冰片+AST IV+PNS 能显著下调 mrp-1 表达水平 ($P<0.01$);PNS 组大鼠脑组织 mrp-4、mrp-5 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。各给药组间比较,冰片+AST IV+PNS 下调 mdrlb、mrp-1、mrp-2、mrp-4、mrp-5 mRNA 表达的作用均显著强于冰片、AST IV、PNS



白色区为梗死灶,红色区为正常脑组织
White area is infarct, and red area is normal brain tissues

图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色

Fig. 1 TTC staining patterns of brain tissues of rats in each group



A-假手术 B-模型 C-冰片 D-AST IV E-PNS F-AST IV+PNS G-冰片+AST IV+PNS H-依达拉奉 与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与AST IV+PNS组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与冰片+AST IV+PNS组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$, 下同

A-Sham group B-model group C-borneol group D-AST IV group E-PNS group F-AST IV + PNS group G-borneol + AST IV + PNS group H-edaravone group $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs AST IV + PNS group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs borneol + AST IV + PNS group, same as below

图2 各组大鼠脑梗死率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Brain infarction rate among each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

及AST IV+PNS ($P < 0.05, 0.01$); AST IV+PNS组下调mdr1b、mrp-4、mrp-5 mRNA表达的作用显著强于AST IV及PNS ($P < 0.05$), 下调mrp-2 mRNA表达的作用显著强于PNS ($P < 0.05$)。

3.4 冰片与AST IV、PNS配伍对MCAO/再灌注模型大鼠脑组织摄取蛋白表达的影响

结果(图4)显示, 与假手术组比较, 模型组

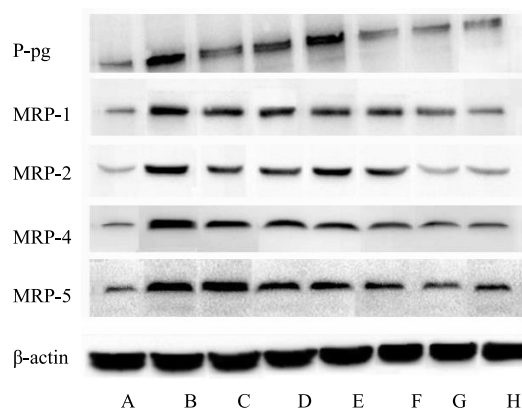


图3 冰片与AST IV、PNS配伍对MCAO/再灌注模型大鼠脑组织外排蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Borneol combined with AST IV and PNS on efflux protein expressions in brain tissues of MCAO/reperfusion rats

大鼠脑组织OATP-3蛋白表达差异不显著, OATP-2蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, PNS组、AST IV+PNS组及冰片+AST IV+PNS组大鼠脑组织OATP-2蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05, 0.01$), 且AST IV+PNS的效应显著强于AST IV、PNS单用 ($P < 0.05, 0.01$), 冰片+AST IV+PNS上调OATP-2蛋白表达的效应显著强于各药物单用及AST IV+PNS ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

以往的研究表明, AST IV+PNS配伍具有增强抗脑缺血性损伤的作用^[4-6]。本研究表明, AST IV+

表2 冰片与AST IV、PNS配伍对MCAO/再灌注模型大鼠脑组织外排蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Borneol combined with AST IV and PNS on efflux protein expressions in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		P-gp	MRP-1	MRP-2	MRP-4	MRP-5
假手术	—	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.03
模型	—	0.40 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.35 ± 0.05 $\Delta\Delta$	0.39 ± 0.07 $\Delta\Delta$	0.39 ± 0.03 $\Delta\Delta$	0.40 ± 0.03 $\Delta\Delta$
冰片	15	0.36 ± 0.03 $*##$	0.33 ± 0.03	0.29 ± 0.03 $**#$	0.35 ± 0.03 $*##$	0.38 ± 0.06 $##$
AST IV	20	0.36 ± 0.04 $*##$	0.33 ± 0.04	0.30 ± 0.03 $**##$	0.34 ± 0.03 $*##$	0.35 ± 0.03 $*##$
PNS	50	0.37 ± 0.03 $*##$	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.04 $*##$	0.34 ± 0.02 $*##$	0.34 ± 0.03 $*##$
AST IV+PNS	20+50	0.32 ± 0.04 $*##$	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.03 $*##$	0.30 ± 0.03 $*##$	0.29 ± 0.04 $*##$
冰片+AST IV+PNS	15+20+50	0.27 ± 0.03 $**$	0.31 ± 0.03	0.23 ± 0.04 $**$	0.26 ± 0.02 $**$	0.24 ± 0.02 $**$
依达拉奉	4	0.28 ± 0.02 $**$	0.28 ± 0.03 $**$	0.24 ± 0.02 $**$	0.24 ± 0.03 $**$	0.26 ± 0.04 $**$

与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与AST IV+PNS组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与冰片+AST IV+PNS组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$, 下表同

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs AST IV + PNS group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs borneol + AST IV + PNS group, same as below

表 3 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织外排蛋白 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Borneol combined with AST IV and PNS on efflux protein mRNA expressions in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量					
		mdr1a	mdr1b	mrp-1	mrp-2	mrp-4	mrp-5
假手术	—	1.00±0.25	0.95±0.16	0.95±0.15	0.78±0.39	0.96±0.24	0.97±0.22
模型	—	2.87±0.38 ^{△△}	3.38±0.47 ^{△△}	2.42±0.48 ^{△△}	2.52±0.53 ^{△△}	2.85±0.58 ^{△△}	3.23±0.47 ^{△△}
冰片	15	2.27±0.52 [*]	2.85±0.49 ^{*##}	1.95±0.31 ^{*#}	2.06±0.26 ^{*##}	2.35±0.30 ^{*##}	2.79±0.34 ^{*##}
AST IV	20	2.41±0.38	2.91±0.30 ^{*##}	2.09±0.36 ^{##}	2.04±0.38 ^{*##}	2.31±0.33 ^{*##}	2.78±0.32 ^{*##}
PNS	50	2.43±0.40	2.99±0.34 ^{*##}	2.05±0.35 [#]	2.23±0.33 ^{*##}	2.30±0.35 ^{*##}	2.76±0.24 ^{*##}
AST IV+PNS	20+50	2.40±0.39	2.45±0.33 ^{*##}	2.00±0.23 [#]	1.76±0.30 ^{*##}	1.84±0.29 ^{*##}	2.33±0.33 ^{*##}
冰片+AST IV+PNS	15+20+50	2.36±0.43	1.98±0.19 ^{**}	1.48±0.38 ^{**}	1.29±0.25 ^{**}	1.39±0.25 ^{**}	1.92±0.24 ^{**}
依达拉奉	4	2.24±0.39 [*]	1.89±0.37 ^{**}	1.46±0.42 ^{**}	1.35±0.33 ^{**}	1.37±0.33 ^{**}	1.91±0.33 ^{**}

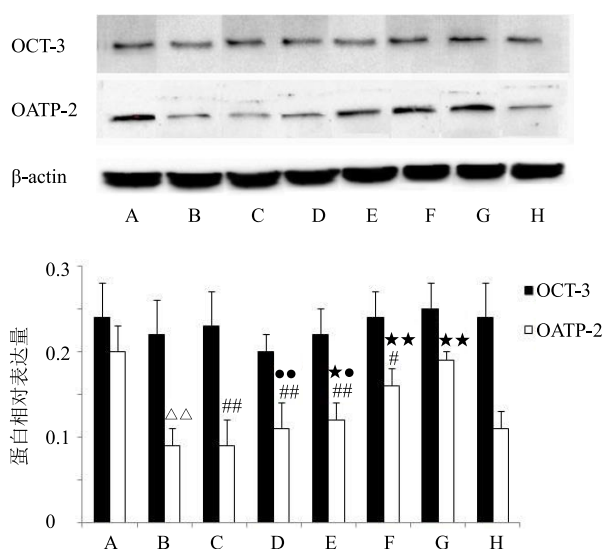


图 4 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织摄取蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of borneol combined with AST IV and PNS on uptake protein expressions in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

PNS 配伍能显著降低 MCAO/再灌注模型大鼠脑梗死率, AST IV+PNS 配伍的效应强于 AST IV 与 PNS 单用, 且冰片配伍 AST IV 和 PNS 后, 其抗缺血性脑损伤的作用强于各药物单用及 AST IV+PNS 配伍, 说明冰片与 AST IV、PNS 配伍时可进一步增强其抗缺血再灌注损伤的作用。

P-gp 属于 ABC 转运体。人 P-gp 包括 MDR1 和 MDR2 基因编码的 2 种不同亚型蛋白, 在啮齿类动物, 编码 P-gp 的基因有 mdr1a、mdr1b 和 mdr2 3 种。实验证明, 人 MDR1 基因合成的 P-gp 与啮齿类 mdr1a 和 mdr1b 基因编码的 P-gp 功能相同, 参与多药耐药性, 而 MDR2 和 mdr2 基因编码的蛋白在 BBB 药物

转运中基本不起作用^[17]。P-gp 表达较多的部位是血-组织屏障, 如 BBB、血脑屏障和胎胎盘屏障^[18]。在脑组织中, P-gp 主要表达于 BBB 毛细血管内皮细胞^[19], 是 ATP 依赖性的药物外排泵, 其方式是主动地将进入脑内的物质转运回脑外的血管中。P-gp 的底物非常广泛, 包括阿片类药物、心血管药物、抗感染药物及抗抑郁和精神疾病药物等。给予 P-gp 抑制剂, 通过抑制药物外排, 可增加药物的脑内浓度, 而且可以改变药物在脑内的动力学参数, 使其更好地发挥治疗作用^[20-21]。实验表明, 炎症、氧化应激、缺血等可上调 P-糖蛋白的表达, 从而促进了药物外排^[19,22]。MRP 是 ABC 超家族的另一转运蛋白, 有 13 个成员, 分布在肝、肠、肾和 BBB 内皮细胞上, 与 BBB 药物转运关系密切的有 MRP-1、MRP-2、MRP-4、MRP-5 等, 主要转运内源性物质及代谢物, 底物有谷胱甘肽、硫酸或葡萄糖醛酸结合物、有机阴离子、抗逆转录酶药物等^[23-24]。MRP 与 P-gp 一样具有外排药物的作用, MRP 基因敲除的小鼠与野生型小鼠相比, 可使某些药物的脑内浓度大幅提高。

本研究表明脑缺血再灌注后, 5 种外排蛋白表达均显著增多, 提示脑缺血后可使 BBB 外排蛋白表达增强, 促进了药物排出脑组织, 使药物进入脑组织减少。冰片能显著下调 P-gp、MRP-2、MRP-4 蛋白表达水平, PNS 能显著下调 MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平, AST IV、AST IV+PNS 与冰片+AST IV+PNS 能显著下调 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达水平, 且冰片+AST IV+PNS 下调 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 蛋白表达的作用显著强于各药物单用及 AST IV+PNS。对外排蛋白相

应基因 *mdr1a*、*mdr1b*、*mrp-1*、*mrp-2*、*mrp-4*、*mrp-5* 表达的检测也与上述各蛋白检测结果相同。表明冰片、AST IV 和 PNS 对脑缺血再灌注后脑组织外排蛋白的表达增强具有一定的抑制作用，冰片配伍 AST IV 与 PNS 后，可增强对多个药物外排蛋白表达的抑制，提示 3 种药物配伍后可减少药物外排，使脑组织中 AST IV 及 PNS 有效成分含量增加，从而增强抗脑缺血性损伤的作用。

OCT 属于溶质转运体超家族，主要有 3 个亚型 OCT 1~3。OCT-1 主要分布于肝脏，OCT-2 主要分布于肾脏，而 OCT-3 分布较广泛，在脑、肠道、骨骼肌、血管、肝脏等组织中均有分布^[25]。在 OCT3 转染的人宫颈癌 HeLa 细胞中，OCT3 可转运内源性和外源性的阳离子，包括苯丙胺、甲非他明、地昔帕明、5-羟色胺和多巴胺等。OATPs 是一类介导多种两亲性化合物转运入细胞的膜转运蛋白^[26]，转运机制是钠离子非依赖性的，不需 ATP 供能来转运底物跨膜。脑内 OATP-2 广泛分布于脉络丛上皮细胞膜及脑微血管内皮细胞膜^[27-28]。

本研究表明，脑缺血再灌注后 OCT-3 蛋白表达水平无显著变化，而 OATP-2 蛋白表达水平显著下降，表明脑缺血可使摄取蛋白 OATP-2 表达减少，从而可能抑制药物的摄取与吸收，使脑组织中药物浓度下降。PNS、AST IV+PNS 及冰片+AST IV+PNS 能显著上调 OATP-2 蛋白表达，且冰片+AST IV+PNS 的效应显著强于各药物单用及 AST IV+PNS。表明冰片配伍 AST IV 与 PNS 可能通过上调脑缺血再灌注后 OATP-2 蛋白表达，促进了 AST IV 及 PNS 有效成分向脑内的吸收，达到增强抗缺血性脑损伤的目的。

综上所述，脑缺血再灌注后，脑组织损伤，BBB 上的主要外排蛋白和基因表达均显著增强，而摄取蛋白 OATP-2 表达显著降低。冰片配伍 AST IV 及 PNS 后，能增强抗缺血性脑损伤的作用，其作用可能与下调 BBB 中外排蛋白 P-gp、MRP-2、MRP-4、MRP-5 基因表达，同时上调摄取蛋白 OATP-2 表达，从而促进脑组织中 AST IV 及 PNS 有效成分的吸收与富集，增强脑组织中药物浓度有关。

参考文献

- [1] Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(5): 889-893.
- [2] Chaves C, Shawahna R, Jacob A, *et al.* Human ABC

transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, doi: 10.2174/13816128113199990466.

- [3] Geier E G, Chen E C, Webb A, *et al.* Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94(6): 636-639.
- [4] Huang X P, Ding H, Lu J D, *et al.* Effects of the combination of the main active components of *Astragalus* and *Panax notoginseng* on inflammation and apoptosis of nerve cell after cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1419-1438.
- [5] Huang X P, Tan H, Chen B Y, *et al.* Combination of total *Astragalus* extract and total *Panax notoginseng* saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(6): 445-452.
- [6] 邱咏园, 唐映红, 王 蓓, 等. 黄芪和三七 4 种有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注早期抗氧化应激物质活性的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(6): 1940-1943.
- [7] 黄小平, 王 蓓, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 220-226.
- [8] 黄小平, 欧阳国, 丁 煌, 等. 黄芪甲苷与三七有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和内质网应激的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2257-2264.
- [9] Chang Y X, Sun Y G, Li J, *et al.* The experimental study of *Astragalus membranaceus* on meridian tropism: The distribution study of astragaloside IV in rat tissues [J]. *J Chromatogr B*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.10.024.
- [10] Zhang W D, Zhang C, Liu R H, *et al.* Preclinical pharmacokinetics and tissue distribution of a natural cardioprotective agent astragaloside IV in rats and dogs [J]. *Life Sci*, 2006, 79(8): 808-815.
- [11] Liu H, Yang J, Du F, *et al.* Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(12): 2290-2298.
- [12] 王利苹, 奉建芳, 胡凯莉. 芳香开窍中药对血脑屏障通透性的调节作用及其机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6): 949-955.
- [13] 刘晓丹, 杨筱倩, 唐 三, 等. 冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响 [J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1649-1656.
- [14] Yu B, Ruan M, Dong X, *et al.* The mechanism of the opening of the blood-brain barrier by Borneol: A pharmacodynamics and pharmacokinetics combination study [J]. *J Ethnopharm*, 2013, 150(3): 1096-1108.

- [15] 顾 振, 韩群颖, 苏殿三, 等. 大鼠短暂性局灶性脑缺血模型改进的制作方法 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2001, 21(6): 513-514.
- [16] 杨筱倩, 陈仙蕾, 杨仁义, 等. 冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷抗脑缺血再灌注损伤有效配伍剂量的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(4): 39-44.
- [17] Chapy H, Smirnova M, André P, *et al.* Carrier-mediated cocaine transport at the blood-brain barrier as a putative mechanism in addiction liability [J]. *Int J Neuropsychoph*, 2014, doi: 10.1093/ijnp/pyu001.
- [18] Cascorbi I. P-glycoprotein: Tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, doi: 10.1007/978-3-642-14541-4_6.
- [19] de Mars K M, Yang C, Hawkins K E, *et al.* Spatiotemporal changes in P-glycoprotein levels in brain and peripheral tissues following ischemic stroke in rats [J]. *J Exp Neurosci*, 2017, 11(11): 1-9.
- [20] O'Mara M L, Mark A E. Structural characterization of two meta-stable ATP-bound states of p-glycoprotein [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91916.
- [21] Iqbal M, Gibb W, Matthews S G. Corticosteroid regulation of P-glycoprotein in the developing blood-brain barrier [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(3): 1067-1079.
- [22] 白如冰, 张忠泉, 岑 娟. P-糖蛋白在神经元中的表达及氧化应激对 P-糖蛋白的影响 [J]. 神经药理学报, 2018, 8(3): 9-14.
- [23] Shen S, Zhang W. ABC transporters and drug efflux at the blood-brain barrier [J]. *Rev Neurosci*, 2010, 21(1): 29-53.
- [24] Miller D S. Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: The good, the bad, and the ugly [J]. *Adv Cancer Res*, 2015, doi: 10.1016/bs.acr.2014.10.002.
- [25] Jonker J W, Schinkel A H. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT 1, 2, and 3 (SLC22A1-3) [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(1): 2-9.
- [26] Hagenbuch B, Meier P J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functiona properties [J]. *Pflugers Arch*, 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1168-y.
- [27] Gao B, Wenzel A, Grimm C, *et al.* Localization of organic anion transport protein 2 in the apical region of rat retinal pigment epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(2): 510-514.
- [28] 郭 艺, 蒋 莉, 刘官信, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞培养及其药物转运体 Oatp2 和 P-gp 的表达 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(4): 560-564.