

的关系,对 CFs 进行 U II、KT5720、SB-611812 干预,结果发现,在 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 U II 基础作用下, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KT5720 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SB-611812 分别进一步作用 CFs, 均可降低 U II 上调 TGF- β 1 水平及促增殖效应,且 KT5720 和 SB-611812 能明显抑制 U II 诱导的 CFs 的胶原合成。这说明 U II 的这些生物效应可能是通过 cAMP-PKA 信号通路完成的。

综上所述,体外培养乳鼠心肌成纤维细胞, U II 明显地上调了 TGF- β 1 水平,促进了 CFs 的增殖及胶原蛋白合成,可能是加速心脏纤维化的重要因素。这一研究结果提示 U II 和心肌纤维化之间可能存在一条新的信号通路,可为慢性心力衰竭及心室肥厚的防治提供新的靶点。目前有关 U II 与心肌纤维化的体内研究较少,通过手术方法造成大鼠心肌梗死模型中,梗死灶及周围可见 UT mRNA 表达增加^[12],表明在各种情况的心肌修复过程中, U II 都显示了与胶原沉积的密切联系,而胶原沉积正是心肌纤维化的始动因素。当然, U II 与心肌纤维化的关系还需系统研究,并且其中的机制还需要探讨。

REFERENCES

- [1] COULOUARN Y, LIHRMANN I, JEGOU S, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15803-15808.
- [2] AMES R S, SARAU H M, CHAMBERS J K, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14 [J]. *Nature*, 1999, 401(6750): 282-286.
- [3] ZHENG S M, HUANG H H, LIU S Z, et al. Protective effect of telmisartan against oxidation-reduction disequilibrium of vascular endothelial cells induced by angiotensin II [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 22-26.
- [4] ZHAO J, DING W, SONG N, et al. Urotensin II-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rat aortic media and a possible involvement of transforming growth factor- β 1/Smad2/3 signaling pathway [J]. *Regulatory Peptides*, 2013(182): 53-58.
- [5] TSOUKAS P, KANE E, GIAID A. Potential clinical implications of the urotensin II receptor antagonists [J]. *Front Pharmacol*, 2011(2): 38. Doi: 10.3389/fphar.2011.00038.
- [6] ZHAO J, DING W, SONG N, et al. Urotensin II-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rat aortic media and a possible involvement of transforming growth factor- β 1/Smad2/3 signaling pathway [J]. *Regulatory Peptides*, 2013(182): 53-58.
- [7] ZUO H H, HONG J M, GUO H S, et al. Urotensin II induces hypertrophy of *in vitro* cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. *J First Mil Med Univ*(第一军医大学学报), 2004, 24(6): 642-645.
- [8] BOUSETTE N, HU F, OHLSTEIN E H, et al. Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(2): 285-95.
- [9] GAO S, OH Y B, SHAH A, et al. Suppression of ANP secretion by somatostatin through somatostatin receptor type 2 [J]. *Peptides*, 2011, 32(6): 1179-1186.
- [10] SHI L, DING W, LI D, et al. Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 188 (2): 260-264.
- [11] TRAN L, KOMPA A R, KEMP W, et al. Chronic urotensin-II infusion induces diastolic dysfunction and enhances collagen production in rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(2): H608- H613.
- [12] TZAMIDIS A, HANNAN R D, THOMAS W G, et al. Direct actions of urotensin II on the heart: Implications for cardiac fibrosis and hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2003, 93(3): 246-253.

收稿日期: 2015-10-20

FTY720 改善颅脑损伤大鼠认知功能及其机制的研究

林群¹, 蔡建勇¹, 吴艳¹, 巴华君¹, 陆川¹, 陈献东¹, 陈茂华¹, 孙军¹, 郑伟民^{2*}(1.温州市中心医院, 温州医科大学定理临床学院, 神经外科, 浙江 温州 325200; 2.温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 研究 FTY720 对颅脑损伤大鼠认知功能的影响及相关机制。方法 选用健康 Wistar 大鼠 60 只, 随机分成假手术组、模型组和治疗组, 每组 20 只, 采用改进的 Feeney 自由落体损伤装置建立大鼠颅脑损伤模型, 分别于模型形成前给予 1 mL 0.9%氯化钠注射液或 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ FTY720 腹腔注射。各组取 10 只大鼠, 采用 Morris 水迷宫定位航行实验, 记录大鼠逃避潜伏期, 评价认知功能。另外各组取 10 只大鼠断头处死, 分离海马组织, 采用 HE 染色观察神经细胞形态, 采用 ELISA 法检测脑组织白介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度。结果 模型组大鼠逃避潜伏期较假手术组显著

基金项目: 浙江省科技计划项目(2014C37029)

作者简介: 林群, 男, 硕士生, 主治医师 Tel: 13757718194 E-mail: linqunn@163.com *通信作者: 郑伟民, 男, 硕士, 教授, 主任医师 Tel: 13706662668 E-mail: zhwm61@126.com

延长($P<0.05$), 海马组织神经细胞结构较假手术组明显破坏($P<0.05$), 脑组织白介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度较假手术组显著升高($P<0.05$)。治疗组大鼠逃避潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$), 海马组织神经细胞结构较模型组明显恢复($P<0.05$), 脑组织白介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度较模型组显著下降($P<0.05$)。结论 FTY720 可显著改善颅脑损伤大鼠认知功能, 其作用机制可能与 FTY720 的中枢炎症抑制作用有关。

关键词: FTY720; 认知功能; 炎症反应; 脑保护作用

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)07-0866-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.008

Study on Improvement of FTY720 on Cognitive Function in Rats with Traumatic Brain Injury and Related Mechanism

LIN Qun¹, CAI Jianyong¹, WU Yan¹, BA Huajun¹, LU Chuan¹, CHEN Xiandong¹, CHEN Maohua¹, SUN Jun¹, ZHENG Weimin^{2*} (1. Department of Neurosurgery, Wenzhou Central Hospital, Dingli Clinical College of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325200, China; 2. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of FTY720 on cognitive function in rats with traumatic brain injury and the related mechanism. **METHODS** All of 60 male Wistar rats were randomly divided to sham-operation group, model group and treatment group with 20 rats in each group. The rat model of traumatic brain injury was induced by a modification of Feeney's weight-drop model. The Rats were administrated intraperitoneally with 1 mL normal saline or 1 mg·kg⁻¹ FTY720 respectively before procedures or trauma. A total of 10 rats in each group underwent assessment of cognitive function using localization navigation experiment from Morris water maze and with recorded escape latency. Another 10 rats in each group were killed by decapitation and then their hippocampus tissues were dissected. HE staining was performed to observe morphology of neuronal cells and ELISA was done to determine the concentrations of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in brain tissues. **RESULTS** As compared with sham-operation group, the escape latencies were markedly prolonged ($P<0.05$), the morphology of neuronal cells in the hippocampus tissues were markedly damaged ($P<0.05$), as well as the concentrations of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in brain tissues were obviously elevated ($P<0.05$) in model group. Compared with model group, the escape latencies were markedly shortened ($P<0.05$), the morphology of neuronal cells in the hippocampus tissues were markedly recovered ($P<0.05$), as well as the concentrations of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in brain tissues were obviously decreased ($P<0.05$) in treatment group. **CONCLUSION** FTY720 can markedly improve the cognitive function of rats with traumatic brain injury and its mechanism may be related to the inhibition of FTY720 on inflammation in central nervous system.

KEY WORDS: FTY720; cognitive function; inflammation; cerebral protective effect

颅脑损伤后脑组织局部免疫应答加重脑组织的继发性脑损伤, 为临床应用免疫抑制疗法治疗颅脑损伤提供一定的实验依据^[1-3]。FTY720 是一种新型的免疫抑制剂, 具有免疫双向调节作用, 在体内抑制免疫反应发生的同时不破坏机体对病毒的免疫应答及免疫记忆能力, 不良反应少, 生物利用度高^[4]。FTY720 用于治疗多发性硬化症和肾移植排斥反应已进入临床研究阶段^[5]。本研究使用 FTY720 腹腔注射治疗大鼠颅脑损伤, 观察其对大鼠认知功能的改善作用, 同时检测海马组织炎症反应的变化, 探讨其神经功能保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

FTY720(美国 Biovision, 批号: SML0700)临

用时根据 1 mg·kg⁻¹ 用量以生理盐水配成 1 mL 注射液; 健康 Wistar 大鼠(南京大学模式动物研究所), ♂, 清洁级, 实验动物生产许可证: SCXK(苏)2005-0003, 使用许可证: SYXK(苏)2005-0004; XR-XM101 型 Morris 水迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司); MK3 型酶标仪(美国 Thermo Scientific); 苏木素-伊红染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: AR1180-100); 白介素-1 β ELISA 试剂盒(美国 R&D, 批号: M6000B); 肿瘤坏死因子- α ELISA 试剂盒(美国 R&D, 批号: MTA00B); 白介素-6 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司, 批号: MLB00C)。

1.2 动物分组

60 只体质量 250~300 g 清洁级的健康 Wistar 大鼠, ♂, 随机分成假手术组、模型组和治疗组,

每组 20 只; 每组中 10 只大鼠用于神经功能评估, 另外 10 只大鼠用于海马组织指标检测。

1.3 模型制作

将假手术组、模型组和治疗组大鼠给予 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 在右侧冠状缝后 1 mm、中线旁开 2 mm 处切开头皮, 钻一直径 5 mm 骨孔, 采用改进的 Feeney 自由落体损伤装置, 用 40 g 重的击锤从 25 cm 处自由坠落冲击撞杆, 打击深度 5 mm, 缝合头皮。大鼠受外力打击后有过性的呼吸抑制, 0.5 h 内基本恢复正常。假手术组大鼠操作完成后 24 h 内无死亡发生, 模型组大鼠模型形成后 24 h 内死亡 3 只, 治疗组大鼠模型形成后 24 h 内死亡 2 只。大鼠死亡后补充成活大鼠, 保证每组 10 只大鼠。经 χ^2 检验, 3 组大鼠死亡率差异无统计学意义。

1.4 动物处理

假手术组和模型组大鼠手术操作完成前或模型形成前 0.5 h 予 0.9% 氯化钠注射液 1 mL 腹腔注射, 治疗组大鼠模型形成前 0.5 h 按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射 FTY720; 24 h 后, 大鼠以 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射戊巴比妥钠深度麻醉, 断头处死, 分离海马组织。

1.5 HE 染色

取部分海马组织, 经固定、脱水后, 常规石蜡包埋, 用 KBL III 型超薄切片机切取厚约 4 μm 的超薄切片, 行常规 HE 染色: ①65 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 20~30 min。②二甲苯 I、II、III 各 10 min, 无水乙醇 95%, 85%, 75% 各 3 min, 蒸馏水冲洗 5 min。③苏木素染色 10 min, 自来水冲洗片刻; 1% 盐酸酒精分化 30 s, 自来水冲洗片刻; 氨水反蓝 1 min, 自来水冲洗; 0.5% 伊红染色 2~5 min, 自来水冲洗。④脱水透明: 无水乙醇 75%, 85%, 95%, 100% I, 100% II 各 2 min; 二甲苯 I、II 各 10 min。⑤中性树胶封片, 晾干、镜检、拍照(每组每只大鼠切片拍 3 张)。光镜下观察神经细胞形态。

1.6 炎症因子的 ELISA 法检测

取部分海马组织制作匀浆, 离心后利用酶联免疫吸附试验测定上清液白介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度: ①实验前将白介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 试剂盒及待测样本放置室温平衡 30 min。②将标准品和待测样本各 50 μL 依次加入孔中, 并做好标记。③37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min

后, 弃去孔内液体, 洗板 5 次。④在各孔中分别加入 50 μL 酶标试剂。⑤37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后, 弃去孔内液体, 洗板 5 次。⑥在各孔中分别加入 100 μL 显色试剂。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min 后, 每孔加终止液 50 μL , 充分混匀, 终止反应。⑦用酶标仪在 450 nm 测定 OD 值。结果计算: 以标准品浓度作为横坐标, OD 值作为纵坐标, 绘制标准曲线, 得出标准方程。根据标准方程计算出每个样本的浓度, 结果表示为 $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

1.7 Morris 水迷宫测试

参照 Vorhees 等^[6]的方法, 于术后 8, 22 d 开始进行 2 周期(每周周期历时 5 d)的 Morris 水迷宫定位航行实验, 记录大鼠逃避潜伏期, 即从大鼠入水到找到水下隐蔽平台至立于其上所需时间。具体测试程序: 将大鼠面向池壁分别从两个象限的入水点放入水中, 记录其在 120 s 内寻找到平台的时间, 即为逃避潜伏期。如果大鼠 120 s 内不能找到平台, 则由实验者用手牵引其到平台上停留 10 s, 再放回到笼中, 记录时间 120 s。此项反应大鼠的学习能力。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件, 指标测定及功能评价均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较应用单变量方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 死亡率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FTY720 对大鼠认知功能的影响

在外伤后第 8, 9, 10, 11, 12, 22, 23, 24, 25 和 26 天, 模型组逃避潜伏期均显著长于假手术组($P < 0.05$); 在外伤后第 8 天和第 9 天, 模型组逃避潜伏期与治疗组比较差异没有统计学意义; 在外伤后第 10, 11, 12, 22, 23, 24, 25 和 26 天, 治疗组逃避潜伏期均较模型组显著缩短($P < 0.05$)。这些数据提示, 脑外伤大鼠认知功能下降, FTY720 能显著改善脑外伤大鼠的认知功能。结果见图 1~2。

2.2 FTY720 对神经细胞形态的影响

假手术组神经细胞完整, 模型组神经细胞结构显著破坏, 治疗组神经细胞结构显著恢复。这些变化提示, FTY720 能够恢复大鼠海马神经细胞外伤性结构破坏。结果见图 3。

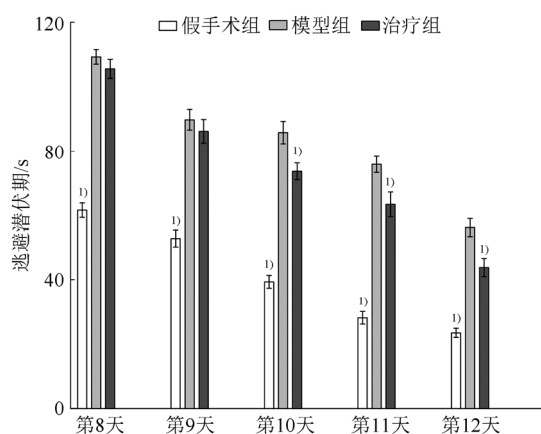


图 1 FTY720 对颅脑损伤大鼠逃避潜伏期的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

与模型组比较, $^{1)}P<0.05$

Fig. 1 Effect of FTY720 on escape latencies of rats with traumatic brain injury($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with model group, $^{1)}P<0.05$.

2.3 FTY720 对炎症因子浓度的影响

模型组大鼠海马组织白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度较假手术组显著升高 ($P<0.05$); 治疗组大鼠海马组织白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度较模型组显著降低 ($P<0.05$)。这些数据提示, 大鼠海马组织颅脑损伤后白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 释放增加, 而 FTY720 可抑制这些因子的释放。结果见图 4。

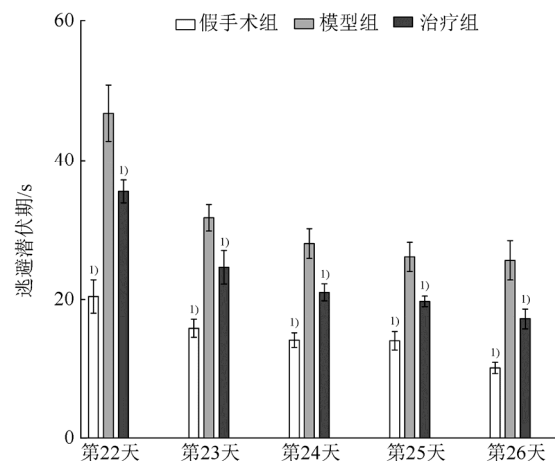


图 2 FTY720 对颅脑损伤大鼠逃避潜伏期的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

与模型组比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of FTY720 on escape latencies of rats with traumatic brain injury($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with model group, $^{1)}P<0.05$.

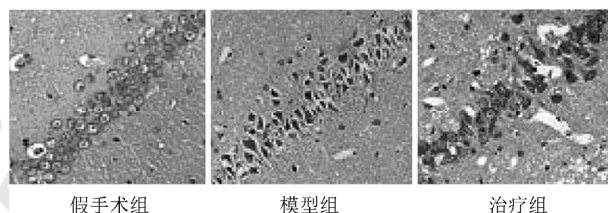


图 3 FTY720 对神经细胞形态的影响(HE, 400 $\times$)

Fig. 3 Effect of FTY720 on morphology of neuronal cells (HE staining, 400 $\times$)

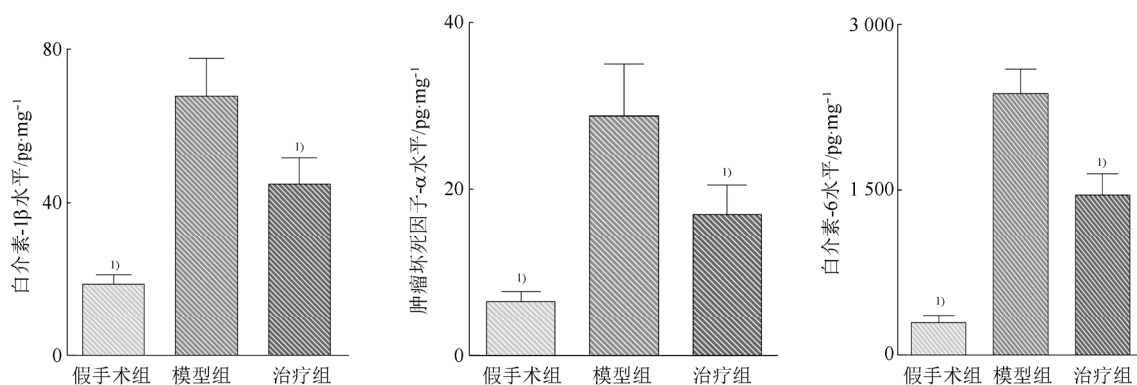


图 4 FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 水平的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

与模型组比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of FTY720 on interleukin- 1β , tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels in hippocampus tissues of rats with traumatic brain injury($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with model group, $^{1)}P<0.05$.

3 讨论

颅脑损伤发生率高, 预后不佳。脑创伤后血脑屏障受损, 脑内固有免疫细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞等)和外周来源免疫细胞(巨噬/单核细胞、T 细胞、中性粒细胞等)均参与脑组织的炎

症反应中, 释放多种炎症因子、活性氧、化学诱导物, 造成脑组织损伤^[1-3]。因此, 免疫抑制可能成为改善颅脑损伤后继发性脑损伤的重要方法^[7-8]。

FTY720 是将冬虫夏草抽提物中具有免疫抑制作用的成分 ISP-I 进行结构改造而成的, 属于鞘

氨醇-1-磷酸盐(S1P)受体阻滞剂^[5]。FTY720 被细胞内鞘氨醇激酶-2 磷酸化为具有生物活性的(S)-FTY720-P 异构体而发挥作用^[9]。FTY720 可抑制器官移植所引起的排斥反应,还可以用于治疗皮炎、重症肌无力等免疫紊乱/障碍疾病及某些转移性癌症^[10-11]。目前动物实验中 FTY720 用于脑损伤治疗的剂量均选用 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,且采用腹腔或静脉注射使用,可以通过血脑屏障^[12-15]。由于腹腔注射相对简单,对动物的干扰较少,本研究采用了 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ FTY720 腹腔注射来研究该药物对颅脑损伤大鼠认知功能的影响及相关机制。本研究设置的假手术组、模型组和治疗组均具有手术创伤的影响,有所区别的是,模型组较假手术组增加了颅脑损伤,而治疗组较模型组增加了药物治疗,因此,手术创伤在 3 组中是均等的,没有影响对药物治疗效果的判断。

目前已有研究证实,FTY720 能有效改善短暂性脑缺血和脑出血大鼠肢体运动功能^[14-15]。少有研究揭示 FTY720 对颅脑损伤大鼠认知功能的影响。本研究采用 Morris 水迷宫定位航行实验,记录大鼠逃避潜伏期,对颅脑损伤大鼠的学习能力进行评价,数据显示,FTY720 可显著缩短大鼠逃避潜伏期,表明 FTY720 可以改善颅脑损伤大鼠的认知功能。FTY720 能显著抑制脑缺血或出血导致的脑水肿,从而降低神经细胞的死亡^[14-15]。本研究通过 HE 染色发现,模型组大鼠海马神经细胞结构较假手术组明显破坏,而治疗组大鼠海马神经细胞结构明显恢复。这些现象说明,FTY720 对恢复神经细胞结构和功能具有重要作用。

在脑组织受到外伤、缺血及缺氧等损害时,小胶质细胞增生活跃,包括核因子- κB 在内的诸多核因子表达增加,通过不同的信号途径与 DNA 结合,从而白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 等炎症因子分泌增加,进而损伤神经细胞,影响神经功能^[16-19]。既往研究提示,FTY720 可抑制体外培养胶质细胞的炎症因子释放^[20],阻止脑外伤大鼠外伤皮层炎症细胞的聚集^[12],可以抑制动物脑出血后脑内淋巴细胞浸润^[13]。本实验检测颅脑损伤后大鼠海马组织白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度来反映脑炎症反应的程度,研究发现,颅脑损伤后海马组织白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度显著升高,表明颅脑损伤后脑炎症反应加剧;给予 FTY720 处理后,这些因

子浓度显著下降,显示 FTY720 可降低颅脑损伤后的炎症反应。这些数据提示,FTY720 对颅脑损伤后脑炎症反应可能具有显著的抑制作用。

FTY720 作为一种新型的免疫抑制剂,本身具有抑制机体炎症反应的作用。本研究发现,FTY720 能显著改善颅脑损伤大鼠认知功能,降低脑组织白介素- 1β 、肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度的影响。因此,推测 FTY720 对颅脑损伤大鼠认知功能的影响可能与其抗炎机制相关。当然,FTY720 对颅脑损伤大鼠认知功能影响的机制尚需作深入研究。本研究参照既往研究^[12-15],FTY720 均在脑损伤动物模型形成前短时间内腹腔或静脉注射使用。目前研究也是初步观察 FTY720 对大鼠脑损伤后神经功能的影响,进一步研究可以观察 FTY720 用药时间对 FTY720 疗效的影响。

综上所述,FTY720 可显著降低大鼠脑外伤后炎症反应,从而改善大鼠认知功能,具有显著的神经保护作用。

REFERENCES

- [1] DE RIVERO VACCARI J C, BRAND F J 3RD, BERTI A F, et al. Mincle signaling in the innate immune response after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(4): 228-236.
- [2] KELSO M L, GENDELMAN H E. Bridge between neuroimmunity and traumatic Brain Injury [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(26): 4284-4298.
- [3] JOHNSON V E, STEWART J E, BEGBIE F D, et al. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury [J]. *Brain*, 2013, 136(1): 28-42.
- [4] PITMAN M R, WOODCOCK J M, LOPEZ A F, et al. Molecular targets of FTY720 (fingolimod) [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(10): 1207-1219.
- [5] PATMANATHAN S N, YAP L F, MURRAY P G, et al. The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(10): 2329-2340.
- [6] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [7] BRUNE K, PATRIGNANI P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs [J]. *J Pain Res*, 2015, 8(1): 105-118.
- [8] SHAO Y P, GAO J B. Curative effect of ulinastatin in the treatment of acute lung injury after severe traumatic brain injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(5): 612-616.
- [9] ZHANG L, WANG H D, JI X J, et al. FTY720 for cancer therapy (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6): 2571-2578.
- [10] ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA A, CASTELLO-CROS R, IMBULUZQUETA E, et al. Lipid nanosystems enhance the bioavailability and the therapeutic efficacy of FTY720 in acute myeloid leukemia [J]. *J Biomed Nanotechnol*,

- 2015, 11(4): 691-701.
- [11] YOSHIDA Y, TSUJI T, WATANABE S, et al. Efficacy of combination treatment with fingolimod (FTY720) plus pathogenic autoantigen in a glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI325-339)-induced arthritis mouse model [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(11): 1739-1746.
- [12] ZHANG Z, ZHANG Z, FAUSER U, et al. FTY720 attenuates accumulation of EMAP-II+ and MHC-II+ monocytes in early lesions of rat traumatic brain injury [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(2): 307-314.
- [13] ROLLAND W B, LEKIC T, KRAFFT P R, et al. Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage [J]. Exp Neurol, 2013, 241(1): 45-55.
- [14] HASEGAWA Y, SUZUKI H, SOZEN T, et al. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats [J]. Stroke, 2010, 41(2): 368-374.
- [15] ROLLAND W B 2ND, MANAENKO A, LEKIC T, et al. FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(2): 213-217.
- [16] HINSON H E, ROWELL S, SCHREIBER M. Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: A systematic review [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 78(1): 184-191.
- [17] ABDUL-MUNEER P M, SCHUETZ H, WANG F, et al. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 60(2): 282-291.
- [18] DONG X Q, YU W H, HU Y Y, et al. Oxymatrine reduces neuronal cell apoptosis by inhibiting Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-B-dependent inflammatory responses in traumatic rat brain injury [J]. Inflamm Res, 2011, 60(5): 533-539.
- [19] DONG X Q, DU Q, YU W H, et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine through inhibition of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinase activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells [J]. Iran J Pharm Res, 2013, 12(1): 165-174.
- [20] JANSSEN S, SCHLEGEL C, GUDI V, et al. Effect of FTY720-phosphate on the expression of inflammation-associated molecules in astrocytes *in vitro* [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6171-6177.

收稿日期: 2015-11-30

和厚朴酚、厚朴酚、梔子苷、绿原酸和黄芪甲苷对人和大鼠体外 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 的抑制作用

刘澄铭^{a,b}, 职文倩^{a,b}, 任静^{a,b}, 张培玉^{a,b}, 郜娜^{a*} (郑州大学, a.临床药理研究所; b.临床医学系, 郑州 450052)

摘要: 目的 观察和厚朴酚、厚朴酚、梔子苷、绿原酸和黄芪甲苷 5 种中药成分体外对人和大鼠肝 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 的抑制作用。方法 在人和大鼠肝微粒体孵育体系中, 分别以非那西丁、咪达唑仑和右美沙芬为探针, 应用 HPLC 检测受试物对探针代谢产物生成量的影响, 评估 5 种中药成分对 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 在该体系中的活性影响, 并计算得到抑制率和 IC₅₀。结果 和厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2、CYP2D 的 IC₅₀ 值分别为 5.5、3.9、35.3 和 46.7 μmol·L⁻¹; 厚朴酚对人 CYP1A2、大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 的 IC₅₀ 值分别为 23.8、29.1 和 39.9 μmol·L⁻¹; 梔子苷、绿原酸和黄芪甲苷对 3 种 CYP 酶亚型的 IC₅₀ 均 >100 μmol·L⁻¹; 和厚朴酚对人和大鼠 CYP3A 的 IC₅₀ 均 >100 μmol·L⁻¹; 厚朴酚对人 CYP3A、CYP2D 和大鼠 CYP3A 的 IC₅₀ 均 >100 μmol·L⁻¹。结论 和厚朴酚体外对人和大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 有抑制作用, 厚朴酚体外对人和大鼠 CYP1A2、大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 有抑制作用, 均呈浓度依赖性。

关键词: 和厚朴酚; 厚朴酚; 梔子苷; 绿原酸; 黄芪甲苷; 细胞色素 P450; 肝微粒体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)07-0871-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.009

In Vitro Inhibitory Effects of Honokiol, Magnolol, Geniposide, Chlorogenic Acid, and Astragaloside IV on CYP1A2, CYP3A and CYP2D Activity in Human and Rats

LIU Chengming^{a,b}, ZHI Wenqian^{a,b}, REN Jing^{a,b}, ZHANG Peiyu^{a,b}, GAO Na^{a*} (Zhengzhou University, a.Clinical Pharmacology Research Institute; b.Department of Clinical Medicine, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the *in vitro* inhibitory effects of five kinds of herbal constituents (honokiol, magnolol, geniposide, chlorogenic acid, astragaloside IV) on CYP1A2, CYP3A and CYP2D in human and rat liver microsomes.

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(15A310025); 郑州大学全国大学生创新创业训练计划资助项目(2014xjxm340)

作者简介: 刘澄铭, 男 Tel: 15225096695 E-mail: 1358842624@qq.com *通信作者: 郜娜, 女, 博士, 副教授 Tel: (0371)66912310 E-mail: gaonawei@zzu.edu.cn