

灯盏乙素苷元对帕金森病模型大鼠多巴胺能神经元的保护作用研究

郭晓红^{1*}, 刘颖¹, 刘辉²(1.武汉市医疗救治中心药剂科, 武汉 430023; 2.广州军区武汉总医院药剂科, 武汉 430070)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1360-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.06

摘要 目的:研究灯盏乙素苷元对帕金森病(PD)模型大鼠多巴胺能神经元的保护作用。方法:通过给予大鼠脑立体定位注射脂多糖(LPS)复制PD模型。实验分为空白对照(等容生理盐水)、假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、美多巴(0.034 mg/kg)与灯盏乙素苷元高、中、低剂量(800、400、200 mg/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续3周。背部皮下注射阿朴吗啡诱导进行行为学观察;测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)水平。结果:与模型组比较,灯盏乙素苷元高、中、低剂量组大鼠旋转速度显著减慢($P<0.05$);SOD活性显著增强,GSH含量显著增加,MDA含量显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:灯盏乙素苷元能改善PD模型大鼠的旋转行为,同时可以提高多巴胺能神经元的抗氧化能力,从而对PD大鼠的中枢神经系统发挥保护作用。

关键词 灯盏乙素苷元;脂多糖;帕金森病;多巴胺能神经元;大鼠

Study on the Protective Effects of Scutellarein on Dopaminergic Neurons of PD Model Rats

GUO Xiao-hong¹, LIU Ying¹, LIU Hui²(1.Dept. of Pharmacy, Wuhan Medical Treatment Center, Wuhan 430023, China; 2.Dept. of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the protective effect of scutellarein on dopaminergic neurons of parkinson's disease (PD) model rats. METHODS: PD rat models were induced by stereotaxic injection of LPS. Model rats were divided into 7 groups, i.e. blank control group (constant volume of normal saline), sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), Madopar group (0.034 mg/kg) and scutellarein high-dose, medium-dose and low-dose groups (800, 400, 200 mg/kg). They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 3 weeks. Apomorphine (apo) was injected subcutaneously on the rat back to observe praxiology of it. The levels of MDA, SOD and GSH were determined. RESULTS: Compared with model group, rotational speed of rats were decreased significantly in scutellarein high-dose, medium-dose and low-dose groups ($P<0.05$); GSH and SOD levels were increased significantly, while MDA level was decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSION: Scutellarein can improve rotation behavior of PD model rats and the ability of anti-oxidation of dopaminergic neurons and protect the central nervous system of PD rats.

KEY WORDS Scutellarein; Lipopolysaccharide; Parkinson's disease; Dopaminergic neurons; Rat

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种较为常见的中枢神经系统变性疾病,其病变主要是由于中脑黑质致密部多巴胺(DA)能神经元变性以及残存神经元细胞DA生物合成能力下降而导致纹状体区DA缺乏引起的^[1]。氧化应激在PD的发生发展中起着重要作用,氧自由基形成导致的DA自身氧化是病情持续进展的重要原因,故针对氧化应激的治疗可以改善PD症状或延缓病情进展^[2]。天然黄酮类化合物作为一种抗氧化剂是一种很好的自由基清除剂^[3]。灯盏花素是从灯盏细辛中提取出来的黄酮类成分,主要由灯盏乙素和灯盏甲素组成,其公认的有效化学成分是灯盏乙素^[4]。灯盏乙素具有扩张血管、增加心脏冠脉流量、增加脑血流量、降低脑血管阻力、提高血脑屏障通透性以及对抗由二磷酸腺苷引起的小板凝集作用,其制剂已用于临床多年^[5]。现代药理学与药动学研究结果表明,口服灯盏乙素后在体内真正的吸收与药效形式是灯盏乙素苷元^[6]。有研究^[7]表明,灯盏乙素苷元对过氧化氢导致的PC12细胞的细胞毒作用具有保护作用,且其活性优于灯盏

乙素。但灯盏乙素苷元的抗氧化作用是否对PD具有神经保护作用,在国内外尚少见报道。本研究采用对大鼠单侧纹状体微量注射脂多糖(LPS)以复制PD模型,来探讨灯盏乙素苷元对黑质DA能神经元的抗氧化作用及行为学上的保护作用。

1 材料

1.1 仪器

WDT-II型微电极推进器脑立体定位仪(国营西北光学仪器厂);722型分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

美多巴(上海罗氏制药有限公司,批号:20110704);LPS(批号:L-2880)、阿朴吗啡(APO,批号:M-2680)均购自美国Sigma公司;灯盏乙素苷元(重庆药友制药有限公司,纯度>99.0%);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

Wistar大鼠123只,♀♂兼半,体质量200~240g,由武汉大学动物中心提供[动物生产合格证号:SCXK(鄂)2003-

*副主任药师。研究方向:临床药学。E-mail:1219872648@qq.com

0004]。

2 方法

2.1 模型的复制

大鼠 ip10% 的水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉后, 腹卧位固定于脑立体定位仪上, 头背部剪毛, 常规消毒。在颅顶正中部位约前囟所在位置纵向剪一长 10 mm 的窗口, 用钝手术刀片剥离骨膜, 找到前囟并做好标记, 调整前囟与后囟, 使其在同一水平线, 按大鼠脑立体定向图谱定位左侧纹状体尾壳核 (CPu) 坐标 (前囟前 1.2 mm、矢状缝左侧 2.6 mm、硬膜下 5.0 mm), 以牙科钻头钻孔后开颅骨, 用微量注射器将 5 μ l LPS (1.0 μ g/ μ l) 缓慢注射至右侧黑质 (针尖斜面向尾、外侧), 给药速度为 1 μ l/min, 模型组注射 5 μ l PBS, 注射完毕停留 10 min 后缓慢退针, 退针速度为 1.0 mm/min。手术完毕, 以明胶海绵堵塞颅骨孔, 消毒后缝合切口, ip 青霉素缝合皮肤, 创面撒少许消毒粉, 待动物清醒后放回笼内饲养。空白对照组未经任何处理。假手术组仅剥离骨膜。术后第 3 周, 背部 sc 0.025% APO 2 ml/kg。大鼠开始出现旋转后观察 30 min, 计数 30 min 内旋转的总数, 计算每分钟平均转数, >7 r/min 为成功模型。

2.2 分组与给药

实验分为 7 组, 即空白对照 (等容生理盐水)、假手术 (等容生理盐水)、模型 (等容生理盐水)、美多芭 (0.034 mg/kg) 与灯盏乙素苷元高、中、低剂量 (800、400、200 mg/kg) 组。ig 给药, 每天 1 次, 连续 3 周。

2.3 大鼠行为学、组织学检测

观察并记录大鼠 30 min 内旋转次数。

麻醉大鼠, 每只大鼠用生理盐水 250 ml 心脏灌注, 断头取脑, 冰盘上剥离黑质区, 采用玻璃匀浆器, 以生理盐水制备 10% 的匀浆, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备测。分别取大鼠纹状体组织匀浆上清液, 通过分光光度仪用化学比色法测定 GSH、MDA 含量与 SOD 活性。以考马斯亮蓝法检测组织中蛋白含量。

2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异以单因素方差分析比较, 用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 灯盏乙素苷元对 PD 模型大鼠行为学的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠旋转速度显著加快 (P<0.01); 与模型组比较, 灯盏乙素苷元高、中、低剂量组大鼠旋转速度显著减慢 (P<0.05)。灯盏乙素苷元对 PD 模型大鼠行为学的影响见表 1。

3.2 灯盏乙素苷元对 PD 模型大鼠抗氧化指标的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠 GSH 含量显著减少, MDA 含量显著增加, SOD 活性显著减弱 (P<0.01); 与模型组比较, 灯盏乙素苷元高、中、低剂量组 GSH 含量显著增加, MDA 含量显著减少, SOD 活性显著增强 (P<0.01 或 P<0.05)。灯盏乙素苷元对 PD 模型大鼠抗氧化指标的影响见表 2。

4 讨论

MDA 是脂质过氧化反应的产物, GSH、SOD 是体内清除自由基的重要系统, 二者可以减少自由基的生成, 使脂质过氧化物转变成活性较低的物质^[8]。抗氧化保护在动脉硬化、糖尿病、阿尔茨海默病、PD、肌萎缩侧索硬化、脑缺血再灌注、兴奋

表 1 灯盏乙素苷元对 PD 模型大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of scutellarein on the behavior of PD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, mg/kg	旋转速度, r/30 min	
			给药前	给药后
空白对照组	10		0	0
假手术组	10		0	0
模型组	10		241.6 \pm 17.9	243.3 \pm 18.4*
灯盏乙素苷元高剂量组	10	800	242.3 \pm 17.7	209.8 \pm 21.7 [#]
灯盏乙素苷元中剂量组	10	400	243.8 \pm 16.4	214.5 \pm 22.4 [#]
灯盏乙素苷元低剂量组	10	200	241.2 \pm 18.2	224.3 \pm 24.3 [#]
美多芭组	10	0.034	242.2 \pm 18.6	190.7 \pm 20.1 [#]

与假手术组比较: *P<0.01; 与模型组比较: [#]P<0.05

vs. sham operation group: *P<0.01; vs. model group: [#]P<0.05

表 2 灯盏乙素苷元对 PD 模型大鼠抗氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of scutellarein on antioxidant index of PD model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量, mg/kg	GSH, mg/mg	MDA, nmol/mg	SOD, U/mg
空白对照组		23.21 \pm 4.56	8.45 \pm 1.32	27.21 \pm 4.79
假手术组		22.21 \pm 5.21	8.56 \pm 2.13	26.42 \pm 5.30
模型组		14.57 \pm 6.02*	12.87 \pm 2.17*	13.23 \pm 7.21*
灯盏乙素苷元高剂量组	800	19.38 \pm 6.45 [#]	10.63 \pm 3.21 [#]	21.54 \pm 5.45 [#]
灯盏乙素苷元中剂量组	400	17.42 \pm 6.39 [#]	11.13 \pm 3.54 [#]	20.21 \pm 6.83 [#]
灯盏乙素苷元低剂量组	200	16.09 \pm 5.87 [#]	11.42 \pm 4.02 [#]	17.21 \pm 7.64 [#]
美多芭组	0.034	20.51 \pm 5.19 [#]	9.12 \pm 2.43 [#]	22.36 \pm 6.32 [#]

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

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

0.01

性中毒、白内障及衰老等多种疾病过程中发挥重要作用^[7]。

LPS 为革兰阴性细菌细胞壁的主要组成成分, 是一种强有力的致炎因子。将 LPS 直接注入大鼠黑质纹状体内, 可诱导小胶质细胞激活, 被激活的小胶质细胞分泌各种炎症因子和细胞毒性因子, 包括一氧化氮、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 β 、花生四烯酸等, 从而引起黑质 DA 能神经元变性, 其病理变化类似于 PD^[9]。

本研究结果表明, 灯盏乙素苷元可有效地保护 LPS 诱导的黑质神经元损伤。本研究中模型组大鼠黑质纹状体内 GSH、SOD 的水平降低, MDA 的水平增高, 说明脂质过氧化反应增强, 而抗氧化防御机制受损, 出现氧化应激, 细胞膜系统的脂质类物质受到过氧化损害^[9]。而用药组大鼠黑质纹状体内 MDA 含量明显下降, GSH、SOD 水平明显升高, 说明灯盏乙素苷元可以减轻 DA 能神经元的脂质过氧化反应, 对氧化应激所引起的神经损伤具有保护作用。同时, 高、中、低剂量灯盏乙素苷元可使 PD 模型大鼠旋转行为明显减少, 也说明黑质纹状体内 DA 能神经元损伤有所减轻, 其机制可能是通过增强抗氧化防御机制, 减少氧化应激, 进而保护神经元, 起到治疗 PD 的作用。

参考文献

- [1] 国华, 宋军平. 帕金森病发病机制最新国内外研究进展 [J]. 职业与健康, 2012, 28(4): 490.
- [2] 黄月, 赵青赞, 任秀花, 等. 依达拉奉对脂多糖诱导的 PD 大鼠模型神经保护作用的实验研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(1): 53.
- [3] Qian LH, Li NG, Tang YP, et al. Synthesis and bio-acti-

β -七叶皂苷钠在家兔体内的药动学研究

罗 宁^{1*}, 张斯汉¹, 颜 晗², 赵 奎³(1. 深圳市龙岗区人民医院, 广东深圳 518172; 2. 深圳市药品检验所, 广东深圳 518019; 3. 深圳市人民医院, 广东深圳 518019)

中图分类号 R285; R969 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1362-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.07

摘要 目的: 建立家兔血液中七叶皂苷钠的测定方法。方法: 应用酶联免疫吸附分析(ELISA)方法, 测定正常家兔与脑缺血再灌注模型家兔静脉注射 β -七叶皂苷钠(5 mg/kg)后的血药浓度, 并对其药动学参数进行分析。结果: 正常家兔与模型家兔静脉注射 β -七叶皂苷钠后, 主要药动学参数 $t_{1/2\alpha}$ 分别为(0.343 ± 0.061)、(0.854 ± 0.079)h, $t_{1/2\beta}$ 分别为(23.325 ± 10.36)、(34.283 ± 13.74)h, CL分别为(1.600 ± 1.206)、(0.718 ± 0.428)L/h, V_d 分别为(53.827 ± 36.42)、(14.799 ± 10.15)L, AUC_{0-24h} 分别为(2.919 ± 0.981)、(26.417 ± 9.207) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{L})$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为(3.126 ± 1.253)、(27.848 ± 8.745) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{L})$, c_{max} 分别为(4.126 ± 0.927)、(7.905 ± 1.054)mg/L。结论: β -七叶皂苷钠在脑缺血再灌注模型大鼠体内的消除较正常大鼠慢, 在体内停留的时间较长。提示 β -七叶皂苷钠在临床对症治疗时应考虑其药动学特点。

关键词 β -七叶皂苷钠; 家兔; 药动学

Pharmacokinetics Study of β -aescin Sodium in Rabbits

LUO Ning¹, ZHANG Si-han¹, YAN Han², ZHAO Kui³(1. Shenzhen Longgang District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518172, China; 2. Shenzhen Institute for Drug Control, Guangdong Shenzhen 518019, China; 3. Shenzhen People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518019, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of β -aescin sodium in blood of rabbits. METHODS: ELISA method was adopted. The blood concentration of β -aescin sodium in normal rabbits and cerebral ischemia-reperfusion rabbits were determined after i.v. injection of β -aescin(5 mg/kg). The pharmacokinetic parameters were analyzed. RESULTS: After i.v. injection of β -aescin sodium, main pharmacokinetic parameters of normal rabbits vs. model rabbits were as follows: $t_{1/2\alpha}$ were (0.343 ± 0.061) h vs. (0.854 ± 0.079) h; $t_{1/2\beta}$ were (23.325 ± 10.36) h vs. (34.283 ± 13.74) h; CL were (1.600 ± 1.206) L/h vs. (0.718 ± 0.428) L/h; V_d were (53.827 ± 36.42) L vs. (14.799 ± 10.15) L; AUC_{0-24h} were (2.919 ± 0.981) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{L})$ vs. (26.417 ± 9.207) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{L})$; $AUC_{0-\infty}$ were (3.126 ± 1.253) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{L})$ vs. (27.848 ± 8.745) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{L})$; c_{max} were (4.126 ± 0.927) mg/L vs. (7.905 ± 1.054) mg/L. CONCLUSION: The elimination of β -aescin sodium in cerebral ischemia-reperfusion rats is slower than in normal rats, remain inside the body for a long time. The pharmacokinetic characteristics of β -aescin should be considered in the clinical symptomatic treatment.

KEY WORDS β -aescin sodium; Rabbits; Pharmacokinetics

β -七叶皂苷钠是七叶树科植物天师粟或中药娑罗子的干燥成熟果实中提取的三萜皂苷的钠盐, 具有抗炎、抗渗出、提高静脉张力、改善微循环、促进脑功能恢复、促进血肿溶化和

吸收、促进肾上腺皮质分泌皮质类固醇及清除氧自由基等广泛的药理作用^[1]。为探讨 β -七叶皂苷钠在家兔体内的药动学特点, 本研究应用酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked

ty evaluation of scutellarein as a potent agent for the therapy of ischemic cerebrovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(11): 8 208.

[4] 万丽丽, 郭澄, 野黄芩苷药动学研究进展[J]. *中国药房*, 2007, 18(30): 2 385.

[5] 杨丽梅, 顾军, 李建宇, 等. 灯盏乙素衍生物的合成及抗大鼠心肌缺血活性研究[J]. *天津中医药*, 2010, 27(3): 240.

[6] 傅晓钟, 张伟, 王永林, 等. 灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸衍生物的设计、合成与抗氧化活性[J]. *药学学报*, 2011, 46

(5): 548.

[7] 杨静, 陈赛贞, 王婷. 氧化应激致 PC12 细胞凋亡的信号传导途径的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2011, 25(1): 102.

[8] 赵松. 洋金花对 PD 大鼠抗氧化作用的实验研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2008.

[9] 吕风月, 李军泉, 张海燕, 等. 脑室内注射脂多糖致脑内炎症大鼠模型黑质多巴胺能神经元与胶质细胞的早期变化[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(1): 1.

* 副主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0755-28932833。
E-mail: szluoning@sina.com

(收稿日期: 2012-05-10 修回日期: 2012-07-12)