

# 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠的改善作用研究<sup>△</sup>

李万平<sup>1,2\*</sup>, 何小苏<sup>1,2</sup>, 陶磊<sup>1,2</sup>, 崔雪萍<sup>1,2</sup>, 高源<sup>1,2</sup>, 胡园<sup>1,2</sup>, 黄茜<sup>1,2</sup>, 巫秀美<sup>1,2,3#</sup>(1.大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南大理 671003; 2.大理大学药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心, 云南大理 671003; 3.大理大学中国西南药用昆虫及蛛形类资源开发利用2011协同创新中心, 云南大理 671003)

中图分类号 R743;R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0752-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.07

**摘要** 目的:观察芬戈莫德对大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)损伤模型大鼠的改善作用。方法:将雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和芬戈莫德低、中、高剂量组(0.5、1、2 mg/kg),每组8只。除假手术组外其余各组大鼠均采用线栓法复制MCAO/R损伤模型。各给药组大鼠均于再灌注后灌胃相应药物[再灌注1 h(第1天)灌胃1次,再灌注22.5 h(第2天)灌胃1次,随后每24 h灌胃1次,直至再灌注142.5 h(第7天)];假手术组和模型组大鼠均灌胃等容生理盐水,每天1次,连续7 d。记录各组大鼠的神经功能损伤评分、平衡木行走评分、记忆错误[工作记忆错误(WME)、参考记忆错误(RME)和总错误]次数,采用酶联免疫吸附测定法检测其血清炎症细胞因子[白细胞介素6(IL-6)、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]含量,采用氯化三苯基四氮唑染色法检测其脑梗死率。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经缺损评分(给药第1~7天各时间点)、平衡木行走评分(给药第2、4、7天)、记忆错误次数(给药第2、4、7天)、血清炎症细胞因子含量以及脑梗死率均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,芬戈莫德不同剂量组大鼠神经功能损伤评分(低剂量组给药第3~7天各时间点,中、高剂量组给药第2~7天各时间点),平衡木行走评分(低剂量组给药第7天,中剂量组给药第4、7天,高剂量组给药第2、4、7天),RME和总错误次数(低剂量组给药第4、7天,中、高剂量组给药第2、4、7天),WME次数(各剂量组给药第7天),血清IL-6、IL-8、IL-10含量(各剂量组),血清TNF- $\alpha$ 含量(中、高剂量组)以及脑梗死率(中、高剂量组)均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:芬戈莫德灌胃可显著降低MCAO/R损伤模型大鼠的神经功能损伤评分和平衡木行走评分,并减少其记忆错误次数,具有一定的脑保护和记忆功能改善作用。上述作用可能与芬戈莫德下调IL-6、TNF- $\alpha$ 等炎症细胞因子的表达有关。

**关键词** 芬戈莫德;大脑中动脉闭塞/再灌注损伤;神经功能损伤评分;平衡木行走评分;记忆功能;炎症细胞因子;灌胃;大鼠

## Study on Improvement Effects of Fingolimod on MCAO/R Injury Model Rats

LI Wanping<sup>1,2</sup>, HE Xiaosu<sup>1,2</sup>, TAO Lei<sup>1,2</sup>, CUI Xueping<sup>1,2</sup>, GAO Yuan<sup>1,2</sup>, HU Yuan<sup>1,2</sup>, HUANG Xi<sup>1,2</sup>, WU Xiumei<sup>1,2,3</sup>  
(1. Yunnan Provincial Key Lab of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali University, Yunnan Dali 671003, China; 2. National-Local Joint Engineering Research Center of Entomocetics, Dali University, Yunnan Dali 671003, China; 3. Southwest China 2011 Collaborative Innovation Center for Entomocetics and Arachnoidea Resource, Dali University, Yunnan Dali 671003, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To observe improvement effects of fingolimod on middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) injury model rats. **METHODS:** Male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and fingolimod low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.5, 1, 2 mg/kg), with 8 rats in each group. Except for sham operation group, MCAO/R injury model was induced by suture-occluded method in other groups. Administration groups were given relevant medicine intragastrically after reperfusion [1 h after reperfusion (1st day), 22.5 h after reperfusion (2nd day), and then every 24 h until 142.5 h of reperfusion (7th day)]. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. The scores of neurological deficit and balance beam test, the times of memory error [work memory error (WME), reference memory error (RME) and total error] were recorded in each group. The contents of serum inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ ) were determined by ELISA, and triphenyl tetrazolium chloride staining method was used to detect the rate of cerebral infarction. **RESULTS:** Compared with sham operation group, neurological deficit scores (at different time points of 1st-7th day after administration), balance beam test scores (2nd, 4th, 7th day after administration), times of memory error (2nd, 4th, 7th day after administration), the contents of serum inflammatory cytokines and the rate of cerebral infarction were increased significantly in model group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with model group,

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81703742);云南省科技计划项目(No.2017FA050)

\* 硕士研究生。研究方向:心脑血管疾病中药药理学。电话:0872-2214251。E-mail:yjcwlp@163.com

# 通信作者:讲师,博士。研究方向:民族药应用与开发。电话:0872-2214251。E-mail:wxm6865@163.com

neurological deficit scores (low-dose group at different time points of 3rd-7th day, medium-dose and high-dose groups at different time points of 2nd-7th day after administration), balance beam test scores (low-dose group at 7th day, medium-dose group at 4th and 7th day, high-dose group at 2nd, 4th, 7th day), RME times and total error times

(low-dose group at 4th and 7th day, medium-dose group and high-dose group at 2nd, 4th, 7th day after administration), WME times (administrations groups at 7th day after administration), serum contents of IL-6, IL-8 and IL-10 (administrations groups), serum contents of TNF- $\alpha$  (medium-dose and high-does groups) and cerebral infarction rate (medium-dose and high-dose groups) were all decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Intragastric administration of fingolimod can significantly reduce neurological deficit score, balance beam test score and the times of memory error in MCAO/R injury model rats, and has a protective effect on cerebral tissue and memory function. These effects may be related to the down-regulation of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$  by fingolimod.

**KEYWORDS** Fingomode; Middle cerebral artery occlusion/reperfusion injury; Neurological deficit score; Balance beam test score; Memory function; Inflammatory cytokines; Intragastric administration; Rats

脑缺血是危害人类健康的主要疾病之一,脑缺血/再灌注是一个复杂的病理生理过程,也是治疗的关键步骤之一<sup>[1]</sup>。脑缺血发生后,机体通过介导白细胞黏附、浸润于缺血处脑组织,从而引发炎症反应,进而造成脑组织损伤<sup>[2]</sup>。芬戈莫德是从冬虫夏草中分离的免疫相关成分多球壳菌素 1 (ISP-1)经化学修饰后所得的一种新型免疫抑制剂,研究发现其除具有免疫抑制作用外,还对脑卒中以及神经功能损伤具有一定的改善作用<sup>[3]</sup>。Liesz A 等<sup>[4]</sup>研究发现,芬戈莫德可减少大脑中动脉闭塞(MCAO)致脑损伤小鼠脑内侵袭性 T、B 淋巴细胞的数量,但对其梗死灶体积及行为障碍的改善不明显;Nazari M 等<sup>[5]</sup>以 MCAO 模型大鼠为对象,腹腔注射芬戈莫德 0.5 mg/kg 后发现,其梗死灶区域明显缩小,且记忆功能障碍有所改善;陈志强等<sup>[6]</sup>综述了口服芬戈莫德的药动学特征,发现其在人体内的生物利用度可达 93%。现有实验研究大多采用注射给药方式,但该给药方式具有一定的局限性。为此,本研究采用灌胃给药方式,以局灶性脑缺血损伤模型大鼠为对象,初步评价了芬戈莫德的脑保护作用及其对大鼠记忆功能的改善作用,以期为临床药物新剂型的研发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

KL-UP-UV-20KNSY1059 型艾柯超纯水机(成都康宁实验专用纯水设备厂);AE240 型精密电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];TL-16R 型台式高速冷冻离心机(上海市离心机械研究所有限公司);VOR72-X-5 型涡旋机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);RM-200 型八臂迷宫分析测试系统、BL-420 型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);SpectraMax M2 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];D90 型数码相机[尼康光学仪器(中国)有限公司];梯形平衡木(80 cm $\times$ 2.5 cm,实验室自制)。

### 1.2 药品与试剂

芬戈莫德原料药(美国 Sigma 公司,批号:045M4713V,纯度:98%);氯化三苯基四氮唑(TTC)(北京博奥拓达科技有限公司,批号:298-96-4);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4,北京索莱宝科技有限公司,批号:531J021);多聚甲醛、水合氯醛(天津市光复精细化工研究所,批号分别

为 21061011、20120827);生理盐水(贵州天地药业有限责任公司,批号:G17042406);白细胞介素 6(IL-6)、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:04/2018);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 动物

清洁级成年健康雄性 SD 大鼠,8 周龄,体质量 250~280 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[生产合格证号:SCXK(湘)2016-0002]。所有大鼠均于 25 $^{\circ}$ C 室温下喂养,并给予专用标准饲料、水,自由取食、饮水。本研究动物处置方法均符合动物实验伦理学要求。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

挑选平衡木和八臂迷宫训练合格[可在平衡木上自由行走;于八臂迷宫测试中参考记忆错误(RME)次数 $\leq$ 1且工作记忆错误(WME)次数=0]的大鼠 40 只,随机分为 5 组,即假手术组、模型组以及芬戈莫德低、中、高剂量组(0.5、1、2 mg/kg,以生理盐水为溶剂;剂量设置参考文献[5]和本课题组前期研究结果),每组 8 只。参考相关文献<sup>[7-8]</sup>采用线栓法复制大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)损伤模型。所有大鼠术前均禁食 12 h,腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,以仰卧位固定于恒温加热垫上(保持肛温为 37 $^{\circ}$ C),颈部剃毛并进行常规消毒后,于颈正中偏左 0.5 cm 处切口(长度约 1.5 cm),使用眼科镊小心分离右颈总动脉(CCA)至分叉处,并向上分离颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),于 CCA 近心端打活结,于 ECA 处穿双线,其中远心端处的线打死结、近心端处的线(即固定线)打活结以固定线栓;与此同时,用动脉夹夹闭 ICA,在 ECA 双线之间剪一小口,从小口向 ICA 方向插入线栓,用固定线轻轻扎住线栓,松开动脉夹,继续将线栓向颈内方向轻轻推入直至标记处[插入深度约为(18.0 $\pm$ 0.5)mm],扎紧固定线固定线栓,此时线栓头端已通过大脑中动脉(MCA)起始处,进入较细的大脑前动脉(ACA),术后继续保持大鼠体温在 37 $^{\circ}$ C 直至清醒,即实现了 MCAO。记录此时的缺血时间,然后缝合切口。缺血 1.5 h 后,将线栓向颅外方向轻轻拉出,遇到阻力时停止,此时线栓头部已经脱出 ACA 和 ICA,回到 ECA 插线口处,即实现了 ACA 再灌注。假

手术组大鼠只分离CCA、ECA、ICA,除不插入线栓外,其余操作同上。各给药组大鼠均于再灌注后灌胃相应药物[再灌注1 h(第1天)灌胃1次,再灌注22.5 h(第2天)灌胃1次,随后每24 h灌胃1次,直至再灌注142.5 h(第7天)];假手术组和模型组大鼠均灌胃等容生理盐水,每天1次,连续7 d。

## 2.2 神经功能损伤评分

分别于每天给药后1 h时参照改良Longa评分法<sup>[7]</sup>对各组大鼠进行神经功能损伤评分。评分标准——0分:无神经功能损伤症状;1分:轻度损伤,即提尾悬空不能伸展左侧前爪;2分:中度损伤,即行走向左侧转圈;3分:中重度损伤,即行走困难,并向左侧倾倒;4分:重度损伤,即不能自发行走,意识水平下降。

## 2.3 平衡木行走评分

分别于给药第2、4、7天对各组大鼠进行平衡木行走评分。将平衡木平放至距离地面高约100 cm处,其下方垫有厚度为10 cm的海绵垫(避免大鼠从平衡木上掉下受到伤害)。实验前1周对各组大鼠进行训练:每天早晚各训练1次,每次10 min,使其能顺利在平衡木上行走。造模与给药后,分别于给药第2、4、7天进行平衡木实验,并参照相关文献<sup>[9-11]</sup>制定六级评分标准对其进行平衡木行走评分。评分标准——0分:穿过平衡木,不会跌倒;1分:穿过平衡木,且跌倒概率小于50%;2分:穿过平衡木,但跌倒概率大于50%;3分:能穿过平衡木,但瘫痪侧后肢不能协助其向前移动;4分:不能穿过平衡木,但可坐在平衡木上;5分:将大鼠放在平衡木上会掉下来。

## 2.4 记忆功能评价

分别于给药第2、4、7天对各组大鼠进行记忆功能评价。参照相关文献<sup>[12-13]</sup>的八臂迷宫实验方法,在臂远端放置凹槽,分设食物臂(即凹槽内放置食物,其中1、2、4、7臂为食物臂)和无食物臂(即凹槽未放置无食物,其余4臂为无食物臂)。实验前对各组大鼠进行相应训练:将大鼠适当限食(使其体质量控制自由摄食时的80%~85%),将其放于迷宫中央平台内,开启所有的小门,通过感应系统记录大鼠在迷宫中的活动情况,包括大鼠进入各臂的次数、重复进入同一臂的次数,每天测试2次,

连续4周,每次5 min。每只大鼠完成测试后,用乙醇清洗各臂及平台以消除气味对结果的影响。造模与给药后,分别于给药第2、4、7天统计各组大鼠5 min内的WME次数(即大鼠进入食物臂,从臂中出来后再次重复进入该臂的次数)、RME次数(即大鼠进入无食物臂的次数)和总错误次数(WME次数+RME次数)。

## 2.5 血清炎症细胞因子检测

给药第7天,所有大鼠均腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉,以一次性负压采血管采血,室温静置1 h后,于4℃下以3 000 r/min离心15 min,收集血清,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)以多功能酶标仪检测各组大鼠血清IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α含量,严格按照相应试剂盒说明书操作。

## 2.6 脑梗死率检测

采血后断头取脑,沿脑桥上界面切断,去除嗅球,立即放入-20℃冰箱中,20 min后取出,由前向后作连续冠状切片(厚度约为2 mm),共6片。将上述脑切片置入0.2% TTC溶液中,于37℃下避光染色20 min(梗死区域呈白色),取出,随后放入4%中性多聚甲醛溶液中固定24 h,取出,用数码相机拍照,采用生物机能实验系统计算各组大鼠脑梗死率(即梗死区域面积与大脑面积的百分比)。

## 2.7 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用最小显著性差异(LSD)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠神经功能损伤评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠各时间点神经功能损伤评分均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,芬戈莫德不同剂量组大鼠神经功能损伤评分(低剂量组给药第3~7天,中、高剂量组给药第2~7天)均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见表1。

表1 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠神经功能损伤评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 1 Effects of fingolimod on neurological deficit scores of MCAO/R injury model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	给药第1天	给药第2天	给药第3天	给药第4天	给药第5天	给药第6天	给药第7天
假手术组	0	0	0	0	0	0	0
模型组	2.25 ± 0.45**	2.40 ± 0.52**	2.22 ± 0.44**	2.13 ± 0.35**	2.00 ± 0.53**	2.14 ± 0.69**	1.71 ± 0.49**
芬戈莫德低剂量组	2.31 ± 0.48**	1.69 ± 0.63**	1.54 ± 0.52***	1.33 ± 0.49***	0.55 ± 0.52##	0.55 ± 0.52##	0##
芬戈莫德中剂量组	2.15 ± 0.38**	1.69 ± 0.48***	1.54 ± 0.52***	1.17 ± 0.39***	0.55 ± 0.52##	0##	0##
芬戈莫德高剂量组	1.92 ± 0.49**	1.36 ± 0.50***	1.09 ± 0.54***	0.80 ± 0.42***	0.60 ± 0.52***	0##	0##

注:与同时时间点假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与同时时间点模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group at the same time point, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group at the same time point, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

### 3.2 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠平衡木行走评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠各时间点平衡木行走

评分均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,芬戈莫德不同剂量组大鼠平衡木行走评分(低剂量组给药第7天、中剂量组给药第4、7天,高剂量

组给药第2、4、7天)均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表2。

表2 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠平衡木行走评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 Effects of fingolimod on balance beam test scores of MCAO/R injury model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	给药第2天	给药第4天	给药第7天
假手术组	0	0	0
模型组	2.10±1.20**	2.11±0.78**	2.43±0.53**
芬戈莫德低剂量组	1.38±0.77**	1.42±0.67**	0.55±0.52**
芬戈莫德中剂量组	0.83±0.39**	0.83±0.72**	0**
芬戈莫德高剂量组	0.67±0.62***	0.55±0.52**	0**

注:与同时时间点假手术组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与同时时间点模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. sham operation group at the same time point, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group at the same time point, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

### 3.3 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠记忆功能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠各时间点RME、WME及总错误次数均显著增加,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,芬戈莫德不同剂量组大鼠各时间点RME和总错误次数(低剂量组给药第4、7天,中、高剂量组给药第2、4、7天)、WME次数(各剂量组给药第7天)均显著减少,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表3。

表3 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠RME、WME和总错误次数的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ ,次)

Tab 3 Effects of fingolimod on the times of RME, WME and total error of MCAO/R injury model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ , time)

组别	时间点	RME	WME	总错误
假手术组	给药第2天	1.33±0.82	0	1.33±0.82
	给药第4天	1.17±0.75	0	1.17±0.75
	给药第7天	0	0	0
模型组	给药第2天	3.18±1.47**	1.60±1.07*	4.80±2.44**
	给药第4天	3.50±0.93**	2.25±0.71**	5.75±0.89**
	给药第7天	3.71±1.38**	2.57±0.53**	6.29±1.38**
芬戈莫德低剂量组	给药第2天	3.00±1.08*	1.46±1.13**	4.46±1.94**
	给药第4天	1.50±0.67**	0.75±0.62*	2.25±0.45***
	给药第7天	1.36±0.67***	1.09±0.70***	2.45±0.69***
芬戈莫德中剂量组	给药第2天	2.00±1.63*	1.08±0.95*	3.08±2.25*
	给药第4天	1.25±0.62**	0.75±0.45**	2.08±0.67***
	给药第7天	1.00±0.63***	0.55±0.52**	1.55±0.69***
芬戈莫德高剂量组	给药第2天	1.25±0.97**	0.58±0.51*	1.83±1.11**
	给药第4天	0.64±0.50**	0.64±0.50*	1.18±0.60**
	给药第7天	0.64±0.50***	0.64±0.50**	1.27±0.47***

注:与同时时间点假手术组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与同时时间点模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. sham operation group at the same time point, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group at the same time point, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

### 3.4 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠血清IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 含量均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,芬戈莫德各剂量组大鼠血清IL-6、IL-8、IL-10含量以及芬戈莫德中、高剂量组大鼠血清TNF- $\alpha$ 含量均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),详见表4。

表4 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠血清炎症细胞因子含量和脑梗死率的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 4 Effects of fingolimod on serum contents of inflammatory cytokines and cerebral infarction rates of MCAO/R injury model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	IL-6,pg/mL	IL-8,pg/mL	IL-10,pg/mL	TNF- $\alpha$ ,pg/mL	脑梗死率,%
假手术组	57.98±13.23	108.93±9.69	2.50±1.09	11.12±2.19	0
模型组	132.23±9.13**	239.37±15.55**	29.45±4.12**	61.43±8.09**	11.65±6.72**
芬戈莫德低剂量组	103.62±6.90***	188.33±11.02***	20.74±2.41***	49.09±5.29**	9.10±4.08*
芬戈莫德中剂量组	82.94±3.43***	157.65±6.34***	11.51±1.96***	22.33±4.04***	7.21±3.17**
芬戈莫德高剂量组	71.24±7.34***	141.90±9.61***	4.40±1.44**	13.43±4.51**	3.91±2.64**

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, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

### 3.5 芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠脑梗死率的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死率显著升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,芬戈莫德中、高剂量组大鼠脑梗死率均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表4。

## 4 讨论

脑缺血发生后的再灌注是神经功能恢复的基本条件,但也是加重脑组织损伤的重要因素,因此减轻再灌注损伤是脑缺血治疗的首要目的<sup>[14]</sup>。目前,芬戈莫德治疗脑缺血疾病的具体机制尚未阐明,其与临床一线所用药物的治疗机制是否相同、类比是否合理皆有待商榷。因此,本研究在参考文献[5]的基础上,以神经功能损伤评分、平衡木行走评分、记忆错误次数、相关炎症细胞因子含量及脑梗死率为指标,初步考察了芬戈莫德对MCAO/R损伤模型大鼠的脑保护作用,以及对其记忆功能的影响。

神经功能损伤评分和平衡木行走评分是较为经典的测评指标,可反映脑与肢体协调配合的能力;八臂迷宫实验可区分短期的工作记忆和长期的参考记忆,被广泛用于记忆功能的评价,且较Y迷宫、水迷宫等方法更为简便、可行<sup>[13]</sup>。考虑到本研究的实验周期,以及减轻对实验动物的伤害,本课题组在每天考察模型大鼠神经功能损伤评分的基础上,仅对给药第2、4、7天时的平衡木行走评分和记忆错误次数进行了考察。结果显示,芬戈莫德不同剂量组大鼠神经功能损伤评分(低剂量组给

药第3~7天各时间点,中、高剂量组给药第2~7天各时间点)、平衡木行走评分(低剂量组给药第7天、中剂量组给药第4、7天,高剂量组给药第2、4、7天)、RME和总错误次数(低剂量组给药第4、7天,中、高剂量组给药第2、4、7天)、WME次数(各剂量组给药第7天)均较模型组显著降低,差异均有统计学意义。这提示芬戈莫德灌胃可明显减轻MCAO/R损伤模型大鼠的神经功能损伤,提高其平衡能力,并减少其记忆错误次数,具有一定的脑保护作用 and 记忆功能改善作用。

脑缺血会加重缺血区域脑组织的损伤,这种病理生理调控的基础是由TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症细胞因子表达失控所导致的“炎症瀑布效应”<sup>[15-16]</sup>。在脑缺血发生早期,TNF- $\alpha$ 分泌或合成的增加是脑梗死形成的主要原因<sup>[17]</sup>,而IL-6则是急性缺血期脑损伤程度的评价指标之一<sup>[18]</sup>。脑缺血发生后,IL-8的表达会有所增加,同时其可调控TNF- $\alpha$ 的分泌,促进其促炎作用的发挥,提示IL-8在中性粒细胞介导的炎症损伤中具有枢纽作用,可成为脑缺血抗炎治疗研究的新靶标<sup>[19]</sup>。IL-10作为一种多效抗炎因子,对TNF- $\alpha$ 等前炎症细胞因子的表达具有一定的调控作用<sup>[20]</sup>。本研究结果表明,芬戈莫德各剂量组大鼠血清IL-6、IL-8、IL-10含量以及芬戈莫德中、高剂量组大鼠血清TNF- $\alpha$ 含量均较模型组显著降低,差异均有统计学意义。这提示芬戈莫德可抑制MCAO/R损伤模型大鼠相关炎症细胞因子的分泌与表达,其可能是芬戈莫德神经保护作用的机制之一。

综上所述,芬戈莫德灌胃可显著降低MCAO/R损伤模型大鼠的神经功能损伤评分和平衡木行走评分,并减少其记忆错误次数,具有一定的脑保护和记忆功能改善作用。上述作用可能与芬戈莫德下调IL-6、TNF- $\alpha$ 等炎症细胞因子的表达有关。本研究可为芬戈莫德临床治疗缺血性脑疾病提供理论和实验基础,但具体机制仍有待后续研究予以完善。

(致谢:大理大学昆虫生物医药研究院药理药效学研究平台提供条件完成此实验)

## 参考文献

[1] 金凡茂,张枝雪,王音,等. Ento- I 涂膜剂对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 504-508, 528.

[2] YANG P, JIA YH, LI J, et al. Anti-oxidation of tanshinone II<sub>A</sub> and prohibitin on cardiomyocytes[J]. *Chin Herbal Med*, 2010, 2(2): 204-210.

[3] 岳妍,殷樱,虞乐华. FTY720对中枢神经系统影响的研究[J]. 中国药房, 2014, 25(43): 4122-4125.

[4] LIESH A, SUN L, ZHOU W, et al. FTY720 reduces post-ischemic brain lymphocyte influx but does not improve outcome in permanent murine cerebral ischemia[J]. *PLoS One*, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021312.

[5] NAZARI M, KESHAVARZ S, RAFATI A, et al. Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 2016. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.004.

[6] 陈志强,曹运莉,王音,等. 新型口服抗复发性多发性硬化药物:芬戈莫德[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(15): 1215-1216.

[7] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[8] KUGE Y, MINEMATSU K, YAMAGUCHI T, et al. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 1995, 26(9): 1655-1657.

[9] TAKAMATSU Y, ISHIDA A, HAMAKAWA M, et al. Treadmill running improves motor function and alters dendritic morphology in the striatum after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Brain Res*, 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.07.070.

[10] NUDO RJ. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery[J]. *Stroke*, 2007, 38(2 Suppl): S840-S845.

[11] TAKATA K, YAMAUCHI H, TATSUNO H, et al. Is the ipsilateral cortex surrounding the lesion or the non-injured contralateral cortex important for motor recovery in rats with photochemically induced cortical lesions? [J]. *Eur Neurol*, 2006, 56(2): 106-112.

[12] CHEN Z, ZHAO Q, SUGIMOTO Y, et al. Effects of histamine on MK-801-induced memory deficits in radial maze performance in rats[J]. *Brain Res*, 1999. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01739-4.

[13] 储利胜,杨午鸣,邵亮,等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(12): 1066-1067, 1070.

[14] 吴常青,汪春彦,邵旭,等. 补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中草药, 2011, 42(1): 114-117.

[15] BERIDZE M, SHAKARISHVILI R, GOGOKHIA N. Probable role of immunological tolerance to ischemia injury in brain[J]. *Georgian Med News*, 2008(163): 30-35.

[16] SUZUKI S, TANAKA K, SUZUKI N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3): 464-479.

[17] SAIRANEN T, CARPEN O, KARJALAINEN-LINDSBERG OL, et al. Evolution of cerebral tumor necrosis factor-alpha production during human ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2001, 32(8): 1750-1758.

[18] CLARK WM, RINKER LG, LESSOV NS, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal cen-

# 白及醇提物中5种主要活性成分的在体肠吸收特征研究<sup>Δ</sup>

孙慧园<sup>1,2\*</sup>, 陈浩<sup>2</sup>, 梅朝叶<sup>2</sup>, 郑林<sup>1</sup>, 巩仔鹏<sup>1</sup>, 李月婷<sup>1</sup>, 李勇军<sup>3</sup>, 黄勇<sup>1#</sup> (1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0757-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.08

**摘要** 目的: 考察白及醇提物中主要活性成分4-(葡萄糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(A1)、2-异丁基苹果酸(A2)、1,4-二[4-(葡萄糖氧基)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(A3)、二氢菲1(A4)、1,4-二[4-(葡萄糖氧基)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-(4-O-肉桂酰基-6-O-乙酰基)葡萄糖苷(A5)在大鼠肠道中的吸收动力学特征。方法: 以葛根素为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测肠循环液中A1~A5的质量浓度。色谱柱为Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈(含0.1%甲酸)-水(含0.1%甲酸)(梯度洗脱), 流速为0.35 mL/min, 柱温为45 ℃, 进样量为3 μL; 采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正、负离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为 $m/z$  593.2→431.1(A1)、 $m/z$  189.0→129.0(A2)、 $m/z$  725.3→457.2(A3)、 $m/z$  347.1→332.1(A4)、 $m/z$  1 059.3→793.1(A5)、 $m/z$  417.0→267.0(内标)。采用大鼠在体肠循环灌流模型, 以累计吸收转化率( $A$ )和吸收速率常数( $K_a$ )为指标, 考察不同剂量白及醇提物(低、中、高剂量分别为166、333、667 μg/mL)、胆汁、P-糖蛋白(P-gp)抑制剂(维拉帕米)、不同肠段对上述5种成分肠吸收的影响。结果: A1、A2、A3、A4、A5检测质量浓度的线性范围分别为0.22~14.00、0.34~21.75、1.99~127.16、0.15~9.75、0.16~10.00 μg/mL ( $r > 0.99$ ), 定量下限分别为0.22、0.34、1.99、0.15、0.16 μg/mL, 最低检测限分别为0.028、0.085、0.251、0.035、0.010 μg/mL, 日内、日间RSD均小于10%, 方法回收率为83.60%~106.91%, 基质效应不影响待测物的测定。白及醇提物低、中剂量组A1的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著高于高剂量组, 低剂量组A3的 $A$ 值显著高于中、高剂量组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。不结扎组A1、A3的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著低于对照组, 而A4的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著高于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); P-gp抑制剂组A1、A3的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著低于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。空肠组、回肠组、结肠组A1的 $A$ 值以及结肠组A1的 $K_a$ 值, 结肠组A2的 $A$ 、 $K_a$ 值, 回肠组A3的 $A$ 值, 回肠组、结肠组A4的 $A$ 、 $K_a$ 值, 空肠组、回肠组A5的 $A$ 值以及空肠组A5的 $K_a$ 值均显著低于十二指肠组; 而空肠组、回肠组、结肠组A3的 $K_a$ 值均显著高于十二指肠组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: 本研究建立的UPLC-MS/MS法专属性强、灵敏度高、操作简便, 可用于A1~A5的定量分析及药动学研究。白及醇提物中5种活性成分均为全肠道吸收, 且吸收肠段各有不同; A1、A3在肠道中的吸收较多, 可能已达饱和; 胆汁可抑制A1、A2的肠吸收, 但可促进A4的肠吸收; A1~A5可能均不是P-gp的底物。

**关键词** 白及醇提物; 活性化合物; 在体肠循环灌流模型; 超高效液相色谱-串联质谱法; 肠吸收特征

## Study on Intestinal Absorption Characteristics of 5 Active Components in Ethanol Extract from *Bletilla striata*

SUN Huiyuan<sup>1,2</sup>, CHEN Hao<sup>2</sup>, MEI Chaoye<sup>2</sup>, ZHENG Lin<sup>1</sup>, GONG Zipeng<sup>1</sup>, LI Yueting<sup>1</sup>, LI Yongjun<sup>3</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup> [1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

tral nervous system ischemia[J]. *Stroke*, 2000, 31 (7) :

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81460630、U1812403); 贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2017]5601、[2016]5677)、[2016]5613; 贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(No.黔教发KY字[2018]050); 贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]30-29号)

\* 硕士研究生。研究方向: 药动学。电话: 0851-86908468。E-mail: 644265205@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药活性成分及新药开发。电话: 0851-86908468。E-mail: mailofhy@126.com

1715-1720.

[19] 李霖, 李霞, 房绍宽, 等. 白介素8在局灶性脑缺血大鼠脑组织及血清中的表达及地塞米松对其的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2009, 22(4): 275-277.

[20] CLARKE CJ, HALES A, HUNT A, et al. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(5): 1719-1726.

(收稿日期: 2018-09-03 修回日期: 2019-01-10)

(编辑: 张元媛)