

莫诺昔大鼠脑靶向分布研究

熊山^{1,2}, 李敬来², 王晓英², 张文鹏², 张振清^{2*}

(1. 山东省医学科学院 药物研究所, 济南 250062;
2. 军事医学科学院 毒物药物研究所, 北京 100850)

[摘要] **目的:**研究莫诺昔透过局造型脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的能力。**方法:**建立大鼠在体脑血分布模型,探讨神经保护剂莫诺昔在正常组大鼠、假手术组大鼠和局灶性脑缺血再灌注模型组大鼠的脑靶向分布。采用线栓法制作局灶性脑缺血再灌注大鼠模型。造模成功后,3组大鼠尾静脉滴注莫诺昔溶液,待血药浓度达到稳态(55 min)后,取血和左右脑组织,采用已经建立的生物基质中莫诺昔浓度测定的LC-MS/MS方法测定大鼠血浆与脑组织中的莫诺昔浓度,并计算血脑分配系数(lg BB)。**结果:**莫诺昔在局造型脑缺血大鼠左右脑的lg BB分别为(1.36±0.44)和(2.26±0.13),但正常组大鼠和假手术组大鼠的lg BB值较低,药物透过该两组大鼠血脑屏障的能力较差,局灶性脑缺血再灌注模型组大鼠的lg BB值明显高于正常组大鼠和假手术组大鼠。**结论:**较正常组大鼠和假手术组大鼠,莫诺昔可以明显透过局灶性脑缺血再灌注模型大鼠的血脑屏障。

[关键词] 莫诺昔; 局灶性脑缺血再灌注大鼠; 脑血分配系数; 脑分布

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0087-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100087

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0932.013.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:32

Study on Targeting Ddistribution of Morroniside in Rat Brain XIONG Shan^{1,2}, LI Jing-lai², WANG Xiao-ying², ZHANG Wen-peng², ZHANG Zhen-qing^{2*} (1. Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to investigate the steady-state brain-plasma concentration ratio of morroniside in focal cerebral ischemia-reperfusion model rats. **Method:** The *in vivo* rat model was established. The middle cerebral artery occlusion was induced by the intraluminal filament technique. The concentrations of morroniside in the plasma and brain of rats were determined from normal control group, sham-operated group and focal cerebral ischemia-reperfusion model group, and the blood brain partitioning (lg BB) of morroniside was calculated while the plasma concentration of morroniside was in the steady-state via intravenous drip (55 min) by LC-MS/MS. **Result:** Morroniside almost could not pass through the blood brain barrier in normal rats. The lg BB of morroniside in the left and right brain of focal cerebral ischemia-reperfusion model rats were (1.36±0.44) and (2.26±0.13), respectively, which were significantly higher than the normal control group and sham-operated group rats. **Conclusion:** The results demonstrated that morroniside could pass through the blood brain barrier in rats in focal cerebral ischemia-reperfusion model group more easily than normal control and sham-operated group.

[Key words] morroniside; focal cerebral ischemia-reperfusion model rats; blood brain partitioning; brain distribution

[收稿日期] 20140916(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09301003-001-007)

[第一作者] 熊山,博士,从事药代动力学研究,Tel:010-66874610,E-mail:shanxiong83@sohu.com

[通讯作者] *张振清,研究员,博士生导师,从事药物代谢及药代动力学研究,Tel:010-66930632,E-mail:zhangzhenqingpharm@163.com

莫诺昔是从中药山茱萸 *Cornus officinalis* 中提取分离获得的一种环烯醚萜苷类化合物^[1]。经前期药理研究表明,莫诺昔可以促进神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)的生长,并且可以抑制过氧化导致的神经细胞损伤^[2-3]。体内实验证实莫诺昔能够提高局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层总抗氧化能力^[4-5],显著增强超氧化物歧化酶(SOD)活性^[6],降低脑内丙二醛(MDA)的含量,抑制皮质脂质过氧化水平^[7],降低半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性,且存在剂量依赖性,从而发挥抗凋亡作用^[8],其对大鼠局灶性脑缺血再灌注引起的损伤起到一定的保护作用。

但是,正常大鼠组织分布研究结果显示大鼠脑内莫诺昔浓度较低,为阐明莫诺昔透过局造型脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的能力,本研究建立大鼠在体脑血分布模型,研究神经保护剂莫诺昔在正常组大鼠、假手术组大鼠和局灶性脑缺血再灌注模型组大鼠的脑靶向分布,应用已经建立的大鼠血浆和脑组织中莫诺昔浓度测定的 LC-MS/MS 方法^[9-10],测定 3 组大鼠血浆和脑组织中的莫诺昔浓度,并计算脑血分配系数(Ig BB),以阐明莫诺昔在 3 组不同处理组大鼠中透过血脑屏障的能力。本研究对莫诺昔作为神经保护剂的进一步开发和利用具有指导意义。

1 材料

API 5000 三重四极杆串联质谱系统,Analyst 1.5.2 质谱数据处理软件(美国 AB 公司),Shimadzu LC-20AD 二元泵,SIL-20AHT 自动进样器,CTO-20A 柱温箱(日本岛津公司),XW-80A 型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂),IKA T10 basic S25 型匀浆器(德国 IKA 公司),Denver T-214 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),MicroCL 21R 型高速低温离心机(美国 Thermo Scientific 公司),尼龙线栓(货号 2636,级别 A1,北京沙东生物技术有限公司)。莫诺昔(HPLC 测定纯度 > 98.5%,由首都医科大学宣武医院药物研究所提供),金丝桃苷对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号 111521-201004),乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司,批号分别为 Lot121792, Lot121933),甲酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 20120606),水为纯净水。

SD 大鼠,雄性,15 只,体重(250 ± 20) g,由军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(军)2012-0004。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件 色谱条件:Inertsil C8-3 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 5 μm),流动相水(含 1 mmol·L⁻¹ 甲酸钠, A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 5% ~ 20% B; 0.5 ~ 1.0 min, 20% ~ 70% B; 1.0 ~ 3.0 min, 70% ~ 95% B; 3.0 ~ 3.2 min, 95% ~ 5% B; 3.2 ~ 6.0 min, 5% B),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温为 20 °C。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,多反应监测(MRM);莫诺昔与内标金丝桃苷的检测离子对分别选择 *m/z* 429.1/267.3, 487.0/324.3;离子源电压 5 kV;源温度 550 °C,气帘气(curtain gas) 15 L·h⁻¹,碰撞气(CAD) 5 L·min⁻¹,锥孔气体流速(Gas1) 30 L·min⁻¹,去溶剂气体流速(Gas2) 40 L·min⁻¹,去簇电压(DP) 180 V,入口电压(EP) 10 V,碰撞能(CE) 分别为 35, 40 V;碰撞池出口电压(CXP) 15 V。

经方法学验证,该方法专属性、回收率、基质效应、精密度、准确度和稳定性均符合生物样品的测定要求^[9-10]。

2.2 生物样品处理 取待测大鼠血浆或脑组织匀浆样品 50 μL,加入 50 μL 纯净水,混匀后,再分别加入 100 μL 内标溶液(500 μg·L⁻¹ 甲醇溶液)和 150 μL 甲醇溶液,充分振荡 1 min 后,以 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清进样 10 μL 分析。

2.3 模型的制备及评分 本实验采用改良 Zea Longa 线栓法^[11]制作大鼠中动脉闭塞所致局灶性脑缺血再灌注大鼠模型。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(4 mL·kg⁻¹)进行麻醉,将其仰卧,固定在手术台上,颈部备皮,碘伏消毒;取颈部正中稍偏右切口,剪皮,分离皮下组织,分离颌下腺与肌肉组织,暴露颈总动脉;剥离颈总动脉(CCA),颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA);用手术线结扎 ECA, CCA 的近心端,并在 CCA 的远心端备线用以止血,动脉夹夹住 ICA 远心端;在 CCA 剪一“V”形口,将尼龙线栓插入 CCA 内,稍微收紧止血线,取下夹在 ICA 远心端上的动脉夹,将尼龙线栓沿 ICA 管腔送入颅内,直至送至大脑中动脉(MCA)的起始部,线栓入颅的深度应距离 ECA 和 ICA 的分叉处 18 mm 左右,收紧止血线;将用生理盐水浸湿的纱布覆盖在手术伤口,并注意保持一定的温湿度;50 min 后慢慢拔出尼龙线栓,结扎止血线;缝合伤口。术后注意保温,供应水食。

于术后 2 ~ 4 h 进行神经功能评分, Zea Longa

法大于1分的大鼠视为造模成功,参照 Zea Longa 5分制评分方法对实验动物的神经行为学进行评分^[12]。0分:无神经功能损伤;1分:轻微神经功能缺损,不能完全伸展对侧前爪;2分:对侧前肢卷曲;3分:轻度向对侧转圈;4分:严重向对侧转圈;5分:对侧偏瘫。选取2分到3分的模型大鼠于术后24h进行实验。

2.4 实验设计 实验分为正常组、假手术组和局灶性脑缺血再灌注模型组,15只大鼠随机分为3组,每组5只。大鼠腹腔注射10%水合氯醛(2 mL·kg⁻¹),使大鼠进入不完全麻醉状态,将莫诺昔用生理盐水配制成0.2 g·L⁻¹的药液,对大鼠进行尾静脉滴注,先迅速给予0.2 mL的冲击量,然后以2.5 mL·h⁻¹的流速开始静滴并计时,从10 min开始每5 min从大鼠眼球静脉丛取血,持续到55 min时间点。离心管肝素抗凝,以3 000 r·min⁻¹离心10 min,取血浆50 μL。股动脉放血处死大鼠,分别取左、右脑,用生理盐水冲洗干净,并用滤纸吸去水分,按1:5加入蒸馏水,制成匀浆。大鼠血浆与脑组织匀浆均放置在-30℃冰箱保存待测。

2.5 药物透脑性质的计算^[13] 药物透过血脑屏障的能力采用脑组织内药物浓度与血浆中药物浓度的比值:脑血分配系数(lg BB值)来计算。

$$\lg BB = \frac{C_B}{C_P}$$

其中,C_B为稳态时大鼠脑组织内莫诺昔的浓度;C_P为稳态时大鼠血浆中莫诺昔的浓度。

正常组大鼠、假手术组大鼠和脑缺血再灌注模型组大鼠尾静脉滴注莫诺昔(0.2 g·L⁻¹)血浆中的莫诺昔浓度变化曲线。见图1。

正常组大鼠、假手术组大鼠和脑缺血再灌注模型组大鼠尾静脉滴注莫诺昔(0.2 g·L⁻¹)后稳态血药浓度与脑组织中的莫诺昔浓度比值(lg BB)。见图2。

3 讨论

前期的药效实验过程已经证明莫诺昔对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有改善作用,可以增强大鼠皮层的总抗氧化能力,具有神经保护作用。针对引人关注的神经保护活性,笔者已经对莫诺昔在大鼠和比格犬体内的药代动力学特征进行了系统研究^[9,14],并且完成了大鼠组织分布研究^[10]。大鼠组织分布研究结果显示莫诺昔在以30 mg·kg⁻¹的剂量灌胃给药时,大鼠脑组织中的药物浓度非常低。莫诺昔是如何进入大鼠脑内发挥神经保护作用?为

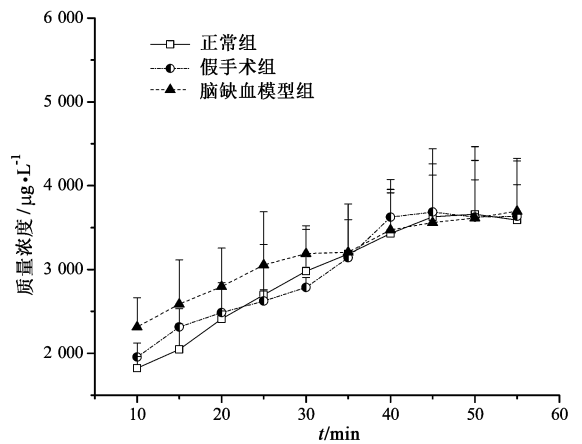
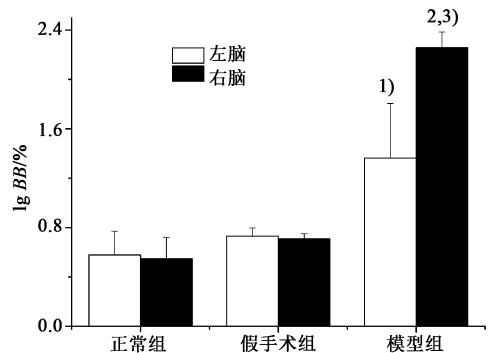


图1 3组大鼠血浆中的莫诺昔浓度曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig.1 Concentration curve of morroniside in rat plasma in three groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与正常组比¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与假手术组比³⁾P<0.01

图2 3组大鼠脑血分配系数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig.2 lg BB in three rat groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

此笔者采用同前期药效实验相同的动物模型——局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型,探讨莫诺昔透过正常组大鼠、假手术组大鼠和脑缺血再灌注模型组大鼠血脑屏障的能力,本实验建立了稳态的脑血平衡模型来进行探讨,进而从药代动力学的角度阐明其发挥神经保护药理作用的可能作用基础。

根据正常大鼠药代动力学实验的血药浓度数据,折算出大鼠在静脉滴注时的药物浓度。本实验首先分别采用3种不同质量浓度莫诺昔溶液(0.2, 0.5, 1 g·L⁻¹)进行预试,确定合适的莫诺昔静滴质量浓度为0.2 g·L⁻¹,合适的静滴速度为2.5 mL·h⁻¹,并且在静脉滴注至40~45 min时,大鼠的血浆药物浓度达到稳态,为保证每个样本在达到稳态后至少有3个血药浓度数据,正式实验时采血持续到55 min。造模时是针对大鼠的右脑进行缺血再灌注的,所以对大鼠左、右脑内的药物浓度都进行了考察。由于脑缺血再灌注导致的脑内自由基过度形

成、兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙超载、炎性反应等,出现细胞膜结构破坏,炎性介质释放等反应,导致左脑的血脑屏障通透性也随之增加,这可能是脑缺血再灌注模型组大鼠的脑血分配系数高于正常组和假手术组的原因^[15]。

实验结果显示,较正常组和假手术组大鼠,脑缺血再灌注模型组大鼠的脑血分配系数有显著提高。说明莫诺昔可能直接进入脑缺血再灌注模型大鼠的脑内发挥神经保护作用,但也有可能作用于外周神经从而反馈到中枢神经发挥相应的保护作用。明确的莫诺昔发挥神经保护作用的机制还需要进一步的研究来阐明。

[参考文献]

[1] Xie X Y, Wang R, Shi Y P. Chemical constituents from the fruits of *Cornus officinalis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 45(7):120-123.

[2] Wang W, Sun F L, An Y, et al. Morroniside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 613 (1/3):19-23.

[3] Wang W, Huang W T, Li L, et al. Morroniside prevents peroxide-induced apoptosis by induction of endogenous glutathione in human neuroblastoma cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28 (2):293-305.

[4] Wang W, Xu J D, Li L, et al. Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 83 (5):196-201.

[5] 艾厚喜,李蕾,许栋明,等.莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层总抗氧化能力影响[J].中国康复理论

与实践,2009,15(9):833-834.

[6] 王文,许栋明,相婕,等.莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经元损伤的影响[J].中国康复理论与实践,2010,16(1):27-28.

[7] 李蕾,许栋明,王文,等.莫诺昔抑制大鼠脑缺血再灌注模型皮层脂质过氧化作用的研究[J].中国康复理论与实践,2009,15(11):1015-1016.

[8] 汪莹,高东明,许栋明,等.莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Caspase-3 活化程度的影响[J].中国康复理论与实践,2009,16(9):801-802.

[9] 熊山,李敬来,朱秀清,等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中莫诺昔血药浓度 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (19):3378-3381.

[10] 熊山,李敬来,吕圭源,等.莫诺昔的大鼠组织分布 [J]. 军事医学,2013,37(10):745-748.

[11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.

[12] 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(3):472-476.

[13] 刘胜敏,杨志宏,孙晓波. LC-MS/MS 测定 6 种丹参主要有效成分及其脑靶向分布研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9):1704-1708.

[14] 熊山,李敬来,朱秀清,等.液相色谱-串联质谱法测定比格犬血浆中的莫诺昔浓度及其药代动力学 [J]. 色谱, 2014, 32(3):290-293.

[15] 王光胜,耿德勤.脑缺血/再灌注损伤机制研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(24):3753-3755.

[责任编辑 邹晓翠]