

芒柄花素磺酸钠在脑缺血再灌注大鼠脑组织的药动学研究

孙瑜¹, 罗西², 王健³, 庄朋伟¹, 宋丽丽¹, 陈磊¹, 乔夕¹

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市胸科医院, 天津 300051

3. 天津市儿童医院, 天津 300074

摘要: 目的 建立脑组织样品中芒柄花素磺酸钠的高效液相色谱分析方法, 确定芒柄花素磺酸钠在脑缺血再灌注大鼠脑内的量-时关系, 明确芒柄花素磺酸钠在模型大鼠脑组织中的吸收分布情况。方法 制备大鼠脑缺血再灌注模型, 随机分为10组, 每组各5只。于脑缺血1h及再灌注3.5h ip 芒柄花素磺酸钠注射液20mg/kg, 并于给药后15、30、45、60、90、120、150、180、240、300min 实施心脏灌注后取脑组织匀浆。样品处理后, 采用HPLC法检测各时间点脑组织中芒柄花素磺酸钠的质量浓度。采用药动学软件WinNonLin 6.3对数据进行分析, 计算药动学参数。结果 模型大鼠缺血1h再灌注4h时给药, 脑组织中芒柄花素磺酸钠含量最高。芒柄花素磺酸钠在模型大鼠脑组织内药动学参数 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 分别为 (261.18 ± 49.33) min、 (1.56 ± 0.37) $\mu\text{g/mL}$ 、 (93.60 ± 7.13) min· $\mu\text{g/mL}$ 。结论 芒柄花素磺酸钠可以进入脑缺血再灌注大鼠脑组织, 滞留时间长。

关键词: 芒柄花素磺酸钠; 脑缺血再灌注; 脑药动学; 高效液相色谱

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)08-1870-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.08.003

Pharmacokinetic study of sodium formononetin-3'-sulphonate in brain of cerebral ischemia-reperfusion rat

SUN Yu¹, LUO Xi², WANG Jian³, ZHUANG Peng-wei¹, SONG Li-li¹, CHEN Lei¹, QIAO Xi¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300051, China

3. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

Abstract: Objective To establish an HPLC analysis method for sodium formononetin-3'-sulphonate (Sul-F) brain tissue samples, and determine the amount-time relationship of Sul-F in cerebral ischemia-reperfusion rats, so as to define the clear absorption and distribution of Sul-F in brain tissue in rats model. **Methods** MCAO rats models were established. Animal models were randomly divided into 10 groups, and each group had 5 rats. At the point of 3.5 h reperfusion after 1 h of cerebral ischemia, rats were ip administered with Sul-F at the dose of 20 mg/kg. At different time points of 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, and 300 min after treatment of heart perfusion, brain tissue homogenate was taken. Samples were treated, then HPLC method was used to detect Sul-F content in brain tissue at different time points. Pharmacokinetic data were analyzed by WinNonLin 6.3 pharmacokinetic software, and pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** When rats in the model group were received 1 h ischemia and 4 h reperfusion, Sul-F had highest content in brain tissue. The pharmacokinetic parameters of Sul-F in MCAO rat model brain tissue were as following: $t_{1/2}$ was (261.18 ± 49.33) min, C_{max} was (1.56 ± 0.37) $\mu\text{g/mL}$, and AUC_{0-t} was (93.60 ± 7.13) min· $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Sul-F can enter the brain tissue of cerebral ischemia-reperfusion rats, and the residence time is long.

Key words: sodium formononetin-3'-sulphonate; cerebral ischemia-reperfusion; brain pharmacokinetic; HPLC

中风也叫脑卒中, 分为出血性中风和缺血性中风, 是常见病^[1]。中药治疗缺血性中风的作用机制主要是通过抗脂质过氧化、降低兴奋性氨基酸毒性、调

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题 (2017104)

作者简介: 孙瑜, 女, 主管药师, 博士, 研究方向为药物代谢动力学、药理学。E-mail: sunrain806@163.com

节脑组织一氧化氮(NO)含量和NO合酶活性、减轻细胞内钙超载、抑制细胞凋亡、抗炎6个方面拮抗脑缺血再灌注损伤的病理生理改变^[2]。芒柄花素是豆科植物黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.中的一种活性成分,目前合成出芒柄花素磺酸钠。该成分具有较好的水溶性,为其在治疗脑中风领域的研究提供了先决条件^[3]。近来有文献报道,芒柄花素磺酸钠可以从多种途径、多种作用环节有效地抑制动脉血栓形成,对于防止心肌梗死、脑缺血和动脉硬化的发展均有益处,对治疗和预防心脑血管系统疾病具有重要的药理学作用^[4]。脑血管病发生后,血脑屏障遭到破坏,其通透性随时间具有一定变化规律。为了深入进行芒柄花素磺酸钠对脑缺血再灌注后血脑屏障的完整性影响的相关探索,本研究在芒柄花素磺酸钠对脑缺血再灌注大鼠脑内量-时关系的研究基础上,找到芒柄花素磺酸钠脑药动学的最佳给药时间;采用高效液相色谱法研究其在大鼠脑缺血再灌注模型脑内的药动学过程,获得药动学参数,从而明确芒柄花素磺酸钠在模型大鼠的脑药动学特征。

1 材料与仪器

1.1 材料

SPF级SD大鼠,雄性,体质量(250±20)g,购于军事医学科学院卫生学环境医学研究所,生产许可证号SCXK-(军)2014-0001。芒柄花素磺酸钠对照品(河北国金药业有限责任公司,批号09092602,质量分数99.5%)。水合氯醛(分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司,批号20020323);肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂,规格2 mL:1.25万单位,批号51140704);乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司,批号150328);甲酸(分析纯,天津市化学试剂一厂,批号20130507);氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号A15012304-2);无水乙醚(天津江天化工技术有限公司,AR/500 mL,批号20150307)。

1.2 仪器

UV-2450紫外分光光度计(日本岛津公司);LC-2010A HT高效液相色谱仪,LC solution工作站(日本岛津公司);PeriFlux System 5000激光多普勒及经皮氧分压测量仪(瑞典Perimed公司);STRONG 90牙科钻(韩国世新精密株式会社);HAC-I浓缩氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);

SIGMA 3K15低温高速离心机(北京五洲东方科技发展有限公司);T 18D S25组织匀浆机(德国IKA公司);微型漩涡混合仪(海门市麒麟医用仪器厂);FA1004上皿电子天平(上海精密科学仪器有限公司);ULT2186-6-V49超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Venusil MP C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(30:70,水相中加0.1%甲酸),体积流量1.0 mL/min,检测波长250 nm,柱温30℃,进样量20.0 μL。

2.2 脑缺血再灌注模型的制备和评价^[5-6]

采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型。用栓线阻断大鼠大脑中动脉,并于缺血后60 min后行再灌注。假手术组只分离、暴露血管,不结扎颈总动脉和颈外动脉,不插入栓线。采用多普勒激光血流仪监测大鼠大脑中动脉栓塞和再灌注后的脑血流动态变化。术中临时阻断颈总动脉,脑血流值稍下降。当栓线顺利进入中动脉时,血流值急剧下降至基础值的20%以下,保留在此水平波动,拔出栓线,脑血流值逐渐恢复到基础水平,表明成功实现再灌注。

2.3 脑组织样品预处理

取出脑组织,置冰袋上,用冷生理盐水洗净(脑去除大血管),滤纸吸干。称定质量后加入3倍于器官质量的生理盐水(6 mL),于冰浴中制成匀浆。取脑匀浆液500 μL,置于2.0 mL EP管中,分别加入一定量芒柄花素磺酸钠对照品溶液和1 000 mL乙腈沉淀蛋白,涡旋振荡5 min,4℃,12 000 r/min离心10 min。取上清液500 μL氮气吹干,加入100 μL流动相复溶,涡旋振荡1 min,4℃,12 000 r/min高速离心10 min,取上清液20 μL(无杂质),即得。

2.4 分组和给药

取SD大鼠禁食不禁水12 h,制备大鼠脑缺血再灌注模型,随机分为10组,每组各5只。于脑缺血1 h后相应时间点ip芒柄花素磺酸钠注射液(将20 g芒柄花素磺酸钠加注射用水至1 000 mL配制而成)20 mg/kg,并于给药后15、30、45、60、90、120、150、180、240、300 min实施心脏灌流后取脑组织匀浆。按血浆样品预处理、脑组织样品预处理方法处理后,采用HPLC法检测各时间点脑组织中的芒柄花素磺酸钠质量浓度,见图1。

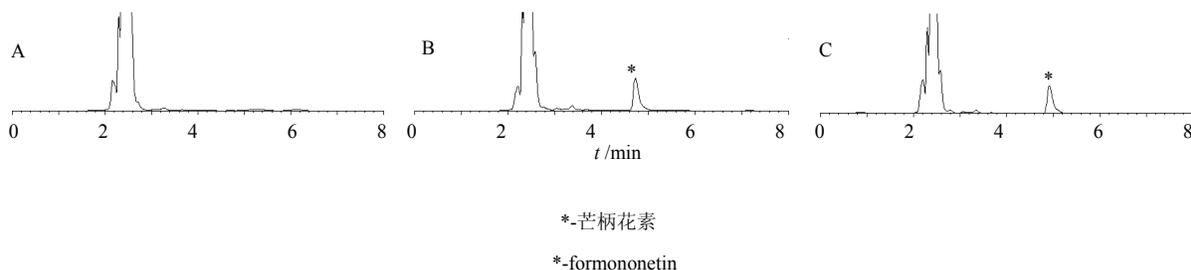


图1 空白脑组织(A)、芒柄花素磺酸钠对照品在空白脑组织匀浆(B)和给药后脑组织(C)的HPLC图
 Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank brain tissue (A), sodium formononetin-3'-sulphonate in blank brain tissue (B), and brain tissue sample after ip administered with sodium formononetin-3'-sulphonate

2.5 方法学考察试验

2.5.1 标准曲线的制备 取空白脑匀浆液 0.5 mL, 分别加入不同量芒柄花素磺酸钠对照品溶液(生理盐水配制), 使脑匀浆液中芒柄花素磺酸钠质量浓度分别为 0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、5.0 μg/mL, 按脑组织样品预处理方法操作。结果芒柄花素磺酸钠在 0.04~5.0 μg/mL 线性关系良好, 其回归方程为 $Y=127\ 014 X+7\ 198.6$ ($r=0.998\ 0$)。

2.5.2 定量下限 配制 0.02 μg/mL 芒柄花素磺酸钠脑组织样品 5 份, 按脑组织样品预处理方法操作。以对照品峰面积计算 RSD 值为 13.04%, 符合药物临床前药动学研究指导原则定量下限 RSD 值小于 20% 的要求。

2.5.3 稳定性试验 配制 1.0 μg/mL 芒柄花素磺酸钠脑组织样品 3 份, 按脑组织样品预处理方法操作, 其中一份于室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进行 HPLC 法检测; 另两份置 -20 °C 冰箱保存, 分别于第 24、48 小时取样测定。结果芒柄花素磺酸钠质量浓度的 RSD 值为 4.36% ($n=9$)。

2.5.4 精密度试验 将芒柄花素磺酸钠对照品的储备液用空白脑匀浆液分别稀释为 0.5、1.0、5.0 μg/mL, 各 5 份, 按脑组织样品预处理方法操作, 并测定药物质量浓度, 同一质量浓度每隔 1 小时测 1 次, 测 3 次, 进行日内精密度计算。每隔 1 天测定 1 次, 测 3 次, 进行日间精密度计算, 见表 1。结果表明, 在上述 3 种质量浓度下, 日内精密度 RSD 值均小于 5.0%, 日间精密度 RSD 值均小于 10.0%。

2.5.5 准确度试验 精密称取芒柄花素磺酸钠对照品适量, 用空白脑匀浆液分别稀释至不同质量浓度, 按脑组织样品预处理方法操作, 进样测定, 计算准确度, 结果见表 2。

2.5.6 提取回收率 配制 0.5、1.0、5.0 μg/mL 芒柄花素磺酸钠样品, 按脑组织样品预处理方法操作,

每个质量浓度各做 5 份, 以配制的芒柄花素磺酸钠对照品溶液为标准, 计算提取回收率, 结果见表 3。

表 1 精密度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Results of precision test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 质量浓度/ (μg·mL ⁻¹) | 日内精密度 | | 日间精密度 | |
|---------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | 测定值/ (μg·mL ⁻¹) | RSD/% | 测定值/ (μg·mL ⁻¹) | RSD/% |
| 0.5 | 0.43±0.02 | 4.66 | 0.42±0.03 | 7.81 |
| 1.0 | 0.93±0.04 | 4.05 | 0.89±0.06 | 6.98 |
| 5.0 | 4.35±0.17 | 4.01 | 4.39±0.36 | 8.27 |

表 2 准确度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Results of accuracy test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 质量浓度/ (μg·mL ⁻¹) | 测定值/ (μg·mL ⁻¹) | 准确度/% | RSD/% |
|---------------------------------|--------------------------------|------------|-------|
| 0.5 | 0.43±0.02 | 86.40±0.04 | 4.66 |
| 1.0 | 0.93±0.04 | 92.79±0.04 | 4.05 |
| 5.0 | 4.35±0.17 | 87.05±0.03 | 4.01 |

表 3 提取回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Results of absolute recovery test ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 质量浓度/ (μg·mL ⁻¹) | 测定值/ (μg·mL ⁻¹) | 回收率/% | RSD/% |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------|-------|
| 0.5 | 0.43±0.02 | 97.21±0.040 | 4.12 |
| 1.0 | 0.93±0.04 | 83.90±0.032 | 3.81 |
| 5.0 | 4.35±0.17 | 95.13±0.038 | 3.96 |

2.6 芒柄花素磺酸钠在脑缺血再灌注大鼠心脏灌流后的脑内量-时关系

复制大鼠脑缺血再灌注模型, 设置假手术组、给药组, 另设对照组。给药组分别于脑缺血 1 h 及再灌注 0、1、4、24、48 h 实施心脏灌流后取脑组织进行匀浆(假手术组、给药组分别于取样前 0.5 h 按 20 mg/kg ip 芒柄花素磺酸钠注射液)。按脑组织

样品预处理方法处理, 采用 HPLC 法测定各时间点脑组织中药物质量浓度 - 时间数据, 见图 2。

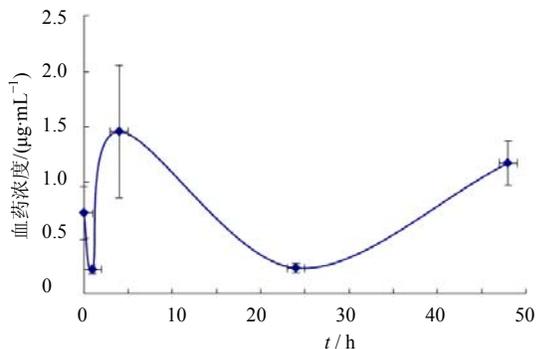


图2 大鼠腹腔注射芒柄花素磺酸钠注射液后心脏灌注后脑组织药物质量浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Mean concentration in rat brain tissue - time curve after ip administered with Sodium Formononetin- 3'-sulphonate Injection and heart perfusion ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.7 模型大鼠给药后的脑组织药动学

模型大鼠于脑缺血 1 h 及再灌注 3.5 h 按 20 mg/kg ip 芒柄花素磺酸钠注射液, 测定脑组织中药物质量浓度 - 时间数据, 见图 3。采用药动学软件 WinNonLin 6.3 对数据进行分析, 计算药动学参数, 结果见表 4。

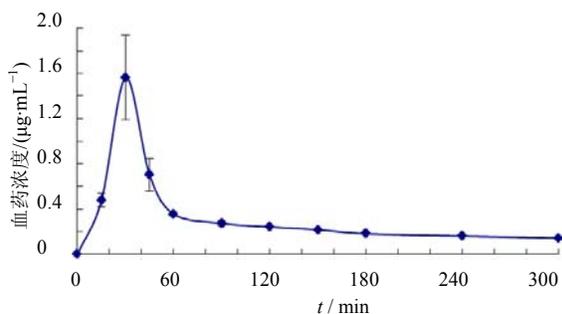


图3 大鼠腹腔注射芒柄花素磺酸钠注射液后脑组织药时曲线 ($n = 5$)

Fig. 3 Concentration in brain tissue -time curve after ip administered with sodium formononetin-3'-sulphonate Injection in rats ($n = 5$)

3 讨论

3.1 给药剂量的选择

根据药物临床前药动力学研究指导原则的要求, 其中 1 个剂量应相当于药效学试验有效剂量, 高剂量一般接近于最大耐受量^[7]。在预实验中分别以 40、20、10 mg/kg 作为高、中、低剂量组给大鼠 ip 芒柄花素磺酸钠注射液, 而以 20 mg/kg 剂量给药后大鼠

表4 大鼠腹腔注射芒柄花素磺酸钠注射液的脑组织药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Brain tissue pharmacokinetic parameters after ip administered with sodium formononetin-3'-sulphonate Injection in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 参数 | 单位 | 数值 |
|------------------|--|----------------------|
| $t_{1/2}$ | min | 261.18 ± 49.33 |
| C_{max} | µg·mL ⁻¹ | 1.56 ± 0.37 |
| AUC_{0-t} | min·µg·mL ⁻¹ | 93.60 ± 7.13 |
| $AUC_{0-\infty}$ | min·µg·mL ⁻¹ | 147.92 ± 13.33 |
| V_d | mL·kg ⁻¹ | 50 737.53 ± 6 890.60 |
| Cl | mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹ | 136.14 ± 13.03 |
| MRT_{0-t} | min | 101.80 ± 4.43 |
| $MRT_{0-\infty}$ | min | 314.36 ± 55.21 |

在实验过程中状态正常。兼顾实验仪器的灵敏度, 并参考相关研究结果^[5, 8-9], 将芒柄花素磺酸钠注射液给药剂量定为 20 mg/kg。

3.2 大鼠脑缺血再灌注模型的评价

目前评价大鼠脑缺血再灌注模型制备成功与否, 多采用神经行为学评分作为检测标准^[10], 而此方法受人为主观因素影响较大。本实验采用当前较为先进激光多普勒脑血流仪测量大鼠大脑中动脉栓塞后的局部脑血流变化, 从而能更客观、更准确地评判模型成功与否^[11]。

3.3 缺血时间与再灌注时间的选择

参阅相关文献报道^[12-16], 在脑缺血时间的确定上, 实验选择缺血 1、2 h 进行考察, 结果发现缺血 1 h 与缺血 2 h 对血脑屏障的损伤程度相近, 但缺血 2 h 大鼠麻醉时间、手术时间均较长, 再灌注 24 h 后, 大鼠死亡率较高, 故选择 1 h 作为缺血时长。再灌注时间则是综合多篇文献报道^[12-16], 选取 0、1、4、24、48 h 关键时间点作为研究对象进行实验考察。

3.4 给药时间的确定

脑缺血 1 h 及再灌注 0、4、48 h 时, 芒柄花素磺酸钠在脑组织中含量相对较高, 脑缺血 1 h 及再灌注 1、24 h 时, 芒柄花素磺酸钠在脑组织中含量相对较低, 且脑缺血 1 h 再灌注 4 h 时, 芒柄花素磺酸钠对血脑屏障的透过率最大。采取脑缺血 1 h 及再灌注 3.5 h 对模型大鼠 ip 芒柄花素磺酸钠注射液, 比血脑屏障透过率最大时 (即脑缺血 1 h 及再灌注 4 h) 提前 0.5 h 给药, 主要考虑到芒柄花素磺酸钠由血液向脑组织分布需要一定时间。

3.5 模型大鼠给药后脑药动力学特征

芒柄花素磺酸钠在模型大鼠脑组织内的半衰期 $t_{1/2}$ 高, 药峰浓度 C_{\max} 低, 药-时曲线下面积 AUC_{0-t} 小, 表观分布容积 V_d 大, 清除率 Cl 高, 体内平均驻留时间 MRT_{0-t} 长, 提示芒柄花素磺酸钠可以进入模型大鼠脑组织, 滞留时间长。

随着人们生活方式的改变, 缺血性脑卒中的发病率呈逐年上升趋势。近年来有文献报道, 芒柄花素可以通过降低脑内 MMPs 活性和 MMP-9 的表达, 以及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素 (IL-1 β) 等炎症因子的表达, 降低脑水肿的发生, 改善神经缺损症状^[17-18]。本实验现已证实脑缺血再灌注发生后, 芒柄花素磺酸钠可以透过血脑屏障进入脑实质, 这样势必能够有效降低脑水肿的发生, 提高缺血性脑卒中的治愈率。本实验是对芒柄花素磺酸钠脑药动力学研究的探讨, 对其脑组织药物质量浓度与药理作用的关联性还将做进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王永炎, 刘炳林. 中风病研究进展述评 [J]. 中国中医急症, 1995, 4(2): 51-54.
- [2] 陈剑梅, 郭洁文, 潘竞箐. 中药治疗缺血性中风的药理研究进展 [J]. 今日药学, 2011, 21(3): 138-141.
- [3] 王秋亚, 孟庆华, 张尊听, 等. 芒柄花素磺化物的合成、溶解性能及降脂保肝活性 [J]. 药学学报, 2000, 44(4): 386-389.
- [4] 万彦军, 庄朋伟, 张艳军. 芒柄花素磺酸钠抗血栓作用及机制研究 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(12): 1355-1358.
- [5] 张淑敏. Sul-F 对心肌损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [6] 杨彬, 余丽娟, 王佳, 等. 全脑缺血/再灌注大鼠皮层 PGI₂ 和 TXA₂ 时程变化特征 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(12): 1667-1671.
- [7] 郑蓓蓓. 化学药品和治疗用和生物用品研究指导原则 (试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 1-21.
- [8] 王本祥. 现代中药药理与临床 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2004: 963.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 35.
- [10] 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.
- [11] 赵瑾, 苑琳, 王驭龙, 等. 线栓法复制昆明小鼠局灶性脑缺血再灌注模型的稳定性研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(7): 1450-1452, 1456.
- [12] 王社军, 蒋传路, 康军, 等. 大鼠脑缺血/再灌注后血脑屏障通透性的改变及转移生长因子 $\beta 1$ 的表达 [J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(1): 51-54.
- [13] 杨允东, 关宁, 罗俊生. 大鼠脑缺血模型血脑屏障结构和功能状态的研究 [J]. 锦州医学院学报, 2005, 26(5): 23-26.
- [14] 袁毅, 雷立芳, 涂秋云, 等. 大鼠脑缺血再灌注中血脑屏障通透性的改变与基质金属蛋白酶 9 表达的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 510-512.
- [15] Pillai D R, Shanbhag N C, Dittmar M S, et al. Neurovascular protection by targeting early blood-brain barrier disruption with neurotrophic factors after ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(4): 557-566.
- [16] 张宇玲, 蔡文杰. 脑缺血再灌注动物模型的血脑屏障损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2848-2850.
- [17] 顾民华, 洪文, 唐传其, 等. 芒柄花素保护前脑缺血再灌注损伤中的血脑屏障并抑制神经炎症 [J]. 南京中医药大学学报, 2015, 36(1): 34-39.
- [18] Gu Y, Chen J, Shen J. Herbal medicines for ischemic stroke: combating inflammation as therapeutic targets [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014, 9(3): 313-339.