

表 3 PE 在小鼠脑、心脏、肺脏、肝脏、肾脏的主要动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of PE in mice brain, heart, lung, liver, and kidney ($\bar{x} \pm s, n = 4$)											
参数	单 位	脑		心 脏		肺 脏		肝 脏		肾 脏	
		HED	HE	HED	HE	HED	HE	HED	HE	HED	HE
AUC	$(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \cdot \text{h}$	8.11±0.45	16.02±0.78	7.49±0.43	4.12±0.23	13.44±0.63	11.79±0.60	9.07±0.43	7.99±0.42	8.71±0.45	18.31±0.97
T_{max}	h	0.56±0.03	2.71±0.13	0.32±0.02	1.44±0.09	1.04±0.05	0.71±0.04	0.29±0.02	1.07±0.06	0.36±0.02	0.17±0.01
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	2.48±0.11	8.27±0.41	3.69±0.18	5.06±0.25	7.50±0.38	4.15±0.22	4.96±0.28	3.24±0.14	5.38±0.30	5.67±0.33
$t_{1/2}$	h	3.95±0.16	1.86±0.86	4.40±0.25	3.07±0.16	3.44±0.18	2.33±0.13	3.53±0.20	2.48±0.16	3.75±0.17	2.76±0.15
CL	$\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$	36.98±2.03	30.17±1.78	46.02±2.85	39.66±2.22	24.50±1.47	38.51±2.43	39.05±2.19	49.13±3.34	37.45±2.58	23.72±1.00
MRT	h	3.57±0.16	3.11±0.20	2.19±0.10	2.94±0.11	2.69±0.13	3.12±0.20	2.88±0.18	2.90±0.19	2.08±0.10	3.57±0.17

其次是心脏和肝脏,再次是肾脏,最慢是脑;PE 被组织的摄取速度 (T_{max}) 是:肝脏最快,其次是心脏和肾脏,再次是脑,最慢是肺脏;E 的最大摄取浓度 (C_{max}) 是:肾脏>肺>心脏>肝脏>脑,PE 的 C_{max} 是:肺>肾脏>肝脏>心脏>脑;平均驻留时间 MRT_{E} 是:肝脏、脑、肺>心脏、肾, MRT_{PE} 是:脑>肝脏、肺>心、肾脏。

4.2 HE 中 E、PE 在组织中主要动力学参数的分析:结果显示 HE 中 AUC_{E} 趋势是:肾脏、肺>脑>肝脏>心脏, AUC_{PE} 是:肾脏、脑>肺>肝脏>心脏;E、PE 的 T_{max} 是:肾脏>肺>肝脏>心脏>脑;E 的最大摄取浓度 C_{max} :脑>肺>心脏>肾脏>肝脏,PE 的最大摄取浓度 C_{max} :脑>肾脏>心脏>肺>肝脏; MRT_{E} 是:肾脏>肝脏、肺、脑>心脏, MRT_{PE} 是:肾脏>肺、脑肝、脏>心脏。

4.3 HED 和 HE 中 E、PE 的药动学参数基本与麻黄归“肺经”并主要经肾脏从尿液以原形排泄的报道相一致。在脑组织中的累积分布量,证明两者均能透过小鼠血脑屏障。E 和 PE 在各组织动力学参数的一致,说明可能是构象的差异影响了其与组织分子或受体的亲和力所致。

4.4 HED 和 HE 中 E、PE 在组织中主要动力学参

数的比较分析: E 在脑、肺、肝、肾脏的分布量是 HE>HED;而 PE 在脑、肾脏的分布量是 HE>HED,在肺脏的分布量相近。提示 HED 中桂枝、苦杏仁、甘草三者影响 E、PE 在某些组织的累积分布量,其机制有待进一步研究。E 是 HE 兴奋中枢的主要成分,HED 相对于 HE 而言其 E 在脑组织分布量降低,表明 HED 具降低单味药 HE 兴奋中枢所导致的失眠、不安等不良反应的可能,而又不失其药效。HE 中 E、PE 在脑、心、肺、肝组织的 $t_{1/2}$ 均小于 HED,为什么 HE 中 E、PE 代谢速度大于 HED,及配伍是否减慢了 E、PE 的代谢,有待进一步研究。

References:

[1] Yang L L, Tu X D. Determination of pseudoephedrine in human plasma by gas chromatography with a mass selective detector (GC-MSD) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1993, 28(9): 709-713.

[2] Mai E D, Wang J H, Yan F Z, *et al.* Determination of pseudoephedrine in rabbit serum by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1994, 14(4): 27-29.

[3] Valentine J L, Middleton R. GC-MS identification of sympathomimetic amine drugs in urine: rapid methodology applicable for emergency clinical toxicology [J]. *J Anal Toxicol*, 2000, 24(3): 211-212.

[4] Zeng J Z. *Analysis of Biology Medicine* (生物药物分析) [M]. 2nd ed. Beijing: Associated Publishing House of Beijing Medical University and Peking Union Medical College, 1998.

麝香抗栓丸对大鼠实验性脑缺血的保护作用

赵红梅, 于晓风, 曲绍春, 徐华丽, 睢大赞*
(吉林大学药学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

摘 要: 目的 观察麝香抗栓丸 (SATP) 对大鼠实验性脑缺血的保护作用。方法 采用大鼠结扎双侧颈总动脉伴低血压模型, 探讨 SATP 对实验性脑缺血大鼠脑含水量、脑组织病理、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、钙离子 (Ca^{2+}) 及乳酸 (LA) 等指标的影响。结果 SATP 能明显降低实验性脑缺血大鼠的脑含水量, 改善脑组织病理变化, 提高脑组织 SOD 活性, 降低 MDA、 Ca^{2+} 及 LA 含量, 水丸的作用效果强于蜜丸。结论 SATP 对大鼠实验

* 收稿日期: 2003-09-03
作者简介: 赵红梅 (1975—), 女, 河北文安人, 吉林大学药学院药理教研室心脑血管药理专业硕士研究生, 主要从事心脑血管药物研究。
* 通讯作者 Tel: (0431) 5619660 E-mail: dayuansui@163.com

性脑缺血具有明显保护作用,可能与其抑制脂质过氧化物损害、提高抗氧化酶活性及降低乳酸酸中毒和细胞内钙超载有关。

关键词:麝香抗栓丸;脑缺血;钙离子;丙二醛;超氧化物歧化酶;乳酸

中图分类号:R 286.10

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2004)07-0784-04

Protection of Shexiang Antithrombosis Pill on experimental cerebral ischemia in rats

ZHAO Hong-mei, YU Xiao-feng, QU Shao-hun, XU Hua-li, SUI Da-yun

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Object** To observe the protective effect of Shexiang Antithrombosis Pill (SATP) on experimental cerebral ischemia in rats. **Methods** In cerebral ischemia model induced by bilateral common carotid artery clamping and controlled hemorrhage to a mean arterial pressure of 6.7 kPa (50 mmHg), cerebral water content, SOD activity, MDA, Ca^{2+} , and LA contents were measured and the ischemic tissue pathology was observed. **Results** SATP can decrease cerebral water content, lessen pathological change, increase SOD activity and decrease MDA, Ca^{2+} , and LA contents. Effect of water pill is better than that of honey pill. **Conclusion** SATP can protect the cerebral tissue from ischemia injury by suppressing lipid peroxidation. This effect may be related to increasing antioxidase activity and decreasing acidosis of LA and overload of calcium in cell.

Key words: Shexiang Antithrombosis Pill (SATP); cerebral ischemia; Ca^{2+} ; MDA; SOD; LA

麝香抗栓丸 (SATP) 系由麝香、水蛭、红花等 22 味中药组成的复方制剂,具有通络活血、醒脑散瘀功能。用于中风、半身不遂、言语不清、头昏、目眩等。因其传统剂型为蜜丸,服用不方便及辅料成分较多而影响疗效。为克服此不足,改原剂型蜜丸为水丸。前期研究表明, SATP (水丸) 能明显降低实验性脑缺血大鼠的全血及血浆黏度,抑制血小板的黏附和聚集功能。本实验通过造成大鼠实验性脑缺血模型进一步观察 SATP 由蜜丸改为水丸后的药效。

1 材料与方法

1.1 动物: Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 250 ~ 300 g,合格证号:医动字第 10-5112,由吉林大学实验动物部提供。

1.2 药品与试剂: SATP 水丸原料药,吉林市蕙丰制药有限公司提供,批号 000415; SATP 蜜丸,吉林市蕙丰制药有限公司提供,批号 000112; SOD、MDA 及 Ca^{2+} 试剂盒,均购于南京建成生物技术研究所以。

1.3 动物分组与给药:取 144 只 Wistar 大鼠,雌雄各半,按体重随机分成 6 组,即:假手术组,模型对照组, SATP 水丸小、中、大剂量 (1.5、3.0、6.0 g 生药/kg) 组及 SATP 蜜丸 (3.0 g 生药/kg) 组,每组 24 只。给药组 ig 相应药物 (1% 羧甲基纤维素钠配成混悬液),假手术组及模型对照组 ig 1% 羧甲基纤维素钠,给药体积均为 1 mL/100 g,每日 1 次,连续给药 14 d。

1.4 模型建立^[1]:动物于末次给药后 1 h 用氯醛糖 0.3 g/kg ip 麻醉,灯照保温,使肛温维持 37 ~

37.5 °C,股动脉插管监测血压,股静脉插管用于再灌。塑料管从颈外静脉插入右心房供放血用。连续记录脑电图 (EEG),用抽血的方法放血,失血达到 10.7 kPa (80 mmHg) 时分离双侧颈总动脉并结扎,再继续抽血,当血压下降到 6.7 kPa (50 mmHg) 时, EEG 呈一直线,此时即造成不完全性脑缺血模型,维持 15 min。假手术组只插管、不放血不结扎。抽出的血放入肝素化试管中 37 °C 水浴保存,以备血压过低时回输。15 min 后,每组取出 10 只动物断头处死,开颅取脑,去除嗅脑、脑干、小脑后,取大脑左侧半球冲净残血,放入 10% 甲醛中固定,常规石蜡包埋, HE 染色,光镜下观察病理改变; 大脑右侧半球放置冰盆上,用冰生理盐水冲去残血,按质量与体积比为 1 : 9 比例在冰浴下以冰生理盐水制备 10% 脑组织匀浆,分装 4 个 1.5 mL Eppendorf 管中。于 4 °C 以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液采用 721 紫外分光光度计分别测定脑组织 SOD 活性、MDA 及 Ca^{2+} 含量,用 lowry 法测组织中蛋白质含量,以对羟基联苯法测定脑组织乳酸 (LA) 含量。每组另取 10 只大鼠断头处死后,开颅取脑,去除嗅脑、小脑、脑干后称脑湿质量,然后放入 110 °C 烘箱中烘至恒重,称其干质量,计算脑含水量。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验进行统计分析。

脑含水量 = (脑湿质量 - 脑干质量) / 脑湿质量 × 100%

2 结果

2.1 SATP 对实验性脑缺血大鼠脑组织病理形态

的影响:大体标本检查可见大鼠大脑皮层沟回不明显,肉眼观察表面及切面各组之间无明显差别;光镜检查:可见假手术组大鼠脑组织神经细胞正常,核膜清楚,核仁明显,神经胶质细胞核仁清楚,胞浆透亮或淡染,毛细血管和小血管管腔较窄或呈一道缝隙,神经细胞、毛细血管和小血管周围都产生一道空隙。脑缺血模型组大鼠脑组织发生明显的病理性改变,神经细胞的胞浆和胞核浓缩、染色深,整个胞体变小,轴突和树突都呈锐角形状,神经细胞及毛细血管、小血管周围的空隙增宽,间质疏松,神经胶质细胞肿胀,其胞浆透亮区加大,尤以室管膜周围的神经胶质细胞肿胀更明显。SATP 水丸各剂量组大鼠脑组织神经细胞浓缩、深染较缺血模型组明显减轻,神经胶质细胞肿胀及间质疏松程度均明显轻于缺血模型组,整个脑组织细胞结构与假手术组大鼠脑组织无明显差异。SATP 水丸与蜜丸之间脑组织形态改变无明显差异。

2.2 SATP 对实验性脑缺血大鼠脑含水量的影响:模型对照组脑含水量与假手术组脑含水量比较差异显著 ($P < 0.001$),说明此模型能引起脑组织明显水肿。与模型对照组比较,SATP 水丸中、大剂量组有

明显减轻脑水肿作用 ($P < 0.05$),SATP 水丸小剂量组及 SATP 蜜丸组对脑含水量有降低趋势,但无统计学差异 ($P > 0.05$),结果见表 1。

2.3 SATP 对实验性脑缺血大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响:与假手术组比较,模型对照组脑组织 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显增加 ($P < 0.05$),表明实验性脑缺血时伴有脑组织自由基的堆积及抗氧化酶活性的降低。SATP 水丸各剂量组均能明显升高脑组织中 SOD 活性,降低 MDA 含量,与模型对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。SATP 蜜丸亦能明显降低脑组织中 MDA 含量 ($P < 0.05$),对 SOD 活性无明显影响。说明 SATP 对缺血后脑组织氧自由基损害有一定保护作用,见表 1。

2.4 SATP 对实验性脑缺血大鼠脑组织 LA 及 Ca^{2+} 含量的影响:与假手术组比较,模型对照组脑组织 LA 及 Ca^{2+} 含量均明显增加 ($P < 0.05, 0.01$),表明实验性脑缺血时脑组织伴有 LA 堆积及钙超载。SATP 水丸各剂量组均能明显降低 LA 及 Ca^{2+} 含量,与模型对照组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。提示 SATP 能减少脑缺血时 LA 酸中毒及钙超载对脑组织的损伤,见表 1。

表 1 SATP 对实验性脑缺血大鼠脑组织含水量、SOD 活性及 MDA、LA 和 Ca^{2+} 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of SATP on water content, SOD activity and MDA, LA and Ca^{2+} contents of brain tissue in experimental cerebral ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)						
组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	脑含水量/%	SOD/(nU · mg ⁻¹)	MDA/(nmol · mL ⁻¹)	LA/(μmol · g ⁻¹)	Ca^{2+} /(mmol · g ⁻¹)
假手术	—	76.99 ± 0.62	10.22 ± 0.90	5.75 ± 1.04	15.71 ± 2.65	0.025 ± 0.010
模型对照	—	78.27 ± 0.66	8.62 ± 1.76	7.10 ± 1.40	22.31 ± 5.24	0.034 ± 0.009
SATP 水丸	1.5	77.88 ± 0.54	10.14 ± 0.88*	5.54 ± 1.43*	18.32 ± 2.15*	0.025 ± 0.007*
	3.0	77.73 ± 0.38*	10.00 ± 1.65*	5.21 ± 1.71*	17.62 ± 2.77*	0.023 ± 0.009*
	6.0	77.70 ± 0.43*	10.22 ± 1.34*	5.11 ± 1.32**	16.76 ± 2.32**	0.020 ± 0.012*
SATP 蜜丸	3.0	77.90 ± 0.38	9.08 ± 1.87	5.19 ± 1.86*	18.24 ± 2.18*	0.021 ± 0.008**
与假手术组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.001$; 与模型对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$						
$P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.001$ vs Sham-operation group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model control group						

3 讨论

近年研究发现,不完全性脑缺血比完全性脑缺血引起的脑损伤更为严重^[1]。脑缺血后的损伤与以下因素有关:兴奋性氨基酸(EAA)增多;细胞内钙超负荷;氧自由基的损伤;LA 酸中毒及花生四烯酸(AA)代谢活性升高。这些因素彼此交叉,共同构成脑缺血后的脑实质损伤^[2]。

脑缺血时由于毛细血管通透性增加,大量血浆成分外渗,尤其是水及小分子物质,引起脑组织明显水肿。脑水肿可使颅内压升高,严重时导致脑疝而危及生命。在脑缺血期间,葡萄糖代谢由有氧化转变为无氧酵解时,促使细胞内 LA 堆积,pH 下降。若 LA 升高超过 25 pmol/g 时,就会产生不可逆的神

经元损伤。LA 堆积对脑组织极为不利。SATP 能明显降低脑组织含水量及 LA 堆积,并减轻脑组织病理改变,提示其可能通过抑制无氧酵解及降低脑水肿发挥对脑缺血的保护作用。

脑缺血时由于兴奋性氨基酸释放增加,作用于受体,引起受体门控型 Ca^{2+} 通道开放,使 Ca^{2+} 大量内流。此外,线粒体及内质网膜 Ca^{2+} -ATP 酶由于能量代谢障碍而不能摄取细胞内过量的 Ca^{2+} 而加重 Ca^{2+} 超载。细胞内超载 Ca^{2+} 可激活磷脂酶 C,使磷脂酰胆碱(PIP₂)转变为三磷酸肌醇(IP₃)和二酯酰甘油(DAG),IP₃作用于其受体,导致细胞内 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} ,各种因素互相交叉促使细胞内 Ca^{2+} 超载。这是最终引起神经元不可逆性坏死的主

要原因。因而有效的降低脑组织中 Ca^{2+} 含量,可减轻脑细胞的不可逆性坏死。SATP 能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 Ca^{2+} 含量,表明其对脑组织的保护作用可能与降低脑组织中 Ca^{2+} 含量有关。

脑缺血时细胞内 Ca^{2+} 超载可激活依赖 Ca^{2+} 蛋白水解酶,促使次黄嘌呤 (Hpy) 代谢生成尿酸,此过程产生大量氧自由基,可攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸引起脂质过氧化反应,形成脂质过氧化物,降低膜的流动性,使膜的通透性增加,大量水分子内流,导致线粒体及细胞肿胀,抑制电子传递和氧化磷酸化,进一步加重能量代谢障碍,溶酶体酶释放引起

细胞自身消化,最终导致细胞死亡^[3,4]。SATP 能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 MDA 含量,提高 SOD 活性,提示其可能通过清除氧自由基及提高抗氧化酶活性对缺血脑组织产生保护作用。

References:

- [1] Smith M L, Bendek G. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat [J]. *Acta Neurol Sci*, 1984, 69(4): 385-401.
- [2] Tang G, Zhang J T. Research advance on mechanism with cerebral ischemic injury and therapeutic policy [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2000, 9(12): 809-812.
- [3] Slater T F. Free-radical mechanism in tissue injury [J]. *Biochem J*, 1984, 222(1): 1.
- [4] Dormandy T L. Free radical oxidation and antioxidants [J]. *Lancet*, 1978, 10(1): 647-651.

山楂果总黄酮的提取分离及体外抗肿瘤活性

张 妍¹, 李厚伟², 孙建平¹, 张永春¹, 何树庄¹, 杨宝峰^{1*}

(1. 哈尔滨医科大学 药理教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 系蔷薇科植物, 含有多种生物活性物质, 如三萜酸、黄酮等。其中黄酮类成分有降压、调血脂、增加冠脉流量、强心、抗肿瘤等药理作用^[1]。由于山楂果实中果胶含量很高, 给提取分离工作带来很大困难, 因此对山楂有效成分的定量研究多集中于山楂叶和山楂核。本实验采用 4 种方法提取山楂果中的总黄酮并进行含量测定, 结果表明以 60% 乙醇为溶剂, 超声提取, 经大孔吸附树脂分离, 提取效率较高, 且方法简便易行。山楂提取物的抗肿瘤活性已有报道^[2], 但其作用机制未见报道。本实验采用激光扫描共聚焦显微镜技术, 通过给药前后细胞内钙和 DNA 含量变化对山楂果总黄酮体外抗肿瘤作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: 山楂: 购于药材市场, 经哈尔滨医科大学药教研室王伟教授鉴定为山楂 *Crataegus Pinnatifida* Bge. 的果实。芦丁对照品: 购于中国药品生物制品检定所。5-氟脲嘧啶注射液 (5-Fu): 上海旭东海普药业有限公司生产, 批号 000101, 用前生理盐水配制。胎牛血清: Hyclone 生产。RPMI1640 培养基: Gibco 生产。噻唑蓝 (MTT): Sigma 生产, 用前以无血清 RPMI1640 配成 1 mg/mL。二甲基亚砜 (DMSO): Sigma 生产。碘化丙啶 (PI) 染料: Sigma 生产, 以生理盐水配成 100 $\mu\text{g/mL}$, 4 $^\circ\text{C}$ 避光

放置。Fluo-3/AM: Bio-Rad 生产, 配成浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$, -20 $^\circ\text{C}$ 保存。RNA 酶 (RNaseA): Calbiochem 分装, 用 PBS 液配成 2.5 mg/mL, 在 80~100 $^\circ\text{C}$ 加热 15 min, 冷至室温后分装, -20 $^\circ\text{C}$ 保存。正丁醇、甲醇、乙醇、氨水、氯化钙均为国产分析纯。实验用水为自制超纯水。

1.2 细胞株: 人喉癌 Hep-2 细胞, 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中 (内含青、链霉素各 100 U/mL, 谷氨酰胺 0.293%), 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 温箱中培养, 每 2~3 d 传 1 代。细胞株由哈尔滨医科大学微生物教研室提供。

1.3 仪器: UV-2201 岛津紫外分光光度计, 日本产。离心机, 北京医疗仪器修理厂。Bio-Rad3550 型酶标仪, 美国产。Insight plus 激光扫描共聚焦显微镜, 美国 Meridian 产。Olympus IX50 倒置显微镜, 日本产。RCO3000TVBB CO_2 温箱, 美国产。

1.4 山楂果总黄酮提取分离方法考察^[3]

1.4.1 提取方法: ① 水煎煮提取: 山楂果肉 30 g, 用蒸馏水煎煮 2 次, 滤过, 浓缩, 得山楂浸膏。② 乙醇回流提取: 取山楂果肉 30 g, 以 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h。合并提取液, 回收乙醇, 得山楂浸膏。③ 甲醇为溶剂, 索氏提取: 取山楂果肉 30 g, 以甲醇为溶剂, 用索氏提取器回流提取 4 h, 回收甲醇, 得山楂浸膏。④ 超声提取: 取山楂果肉 30 g, 加

* 收稿日期: 2003-08-27

作者简介: 张 妍 (1973—), 女, 哈尔滨市人, 讲师, 硕士, 研究方向为药理学。E-mail: zhangyan_lhw@163.com