

三羧酸循环是葡萄糖、甘油、脂肪酸及某些氨基酸彻底氧化分解的共同途径。异柠檬酸脱氢酶 3 是三羧酸循环的关键酶,其活性受许多变构剂调节。线粒体 ATP 合酶是在细胞氧化磷酸化过程中,利用横跨线粒体内膜的质子电化学梯度来催化 ATP 合成的酶。本研究显示,芍药苷能显著上调异柠檬酸脱氢酶和 ATP 合酶在 HFCL 的表达,促进能量代谢,改善骨髓基质细胞的功能。

本研究结果表明,芍药苷作用于骨髓基质细胞多种蛋白质靶点,促进细胞结构蛋白质的合成和蛋白质分子伴侣的表达,促进 HFCL 的能量代谢,抑制 HFCL 凋亡,间接发挥补血作用。本课题组将在进一步工作中研究芍药苷作用的量效关系,并对目标蛋白质进行深入的生物学功能研究,为阐明芍药苷补血作用的分子机制提供依据。

References:

- [1] Guo P, Wang J F, Wang S Q. Effect of paeoniflorin on Epo and G-CSF gene expression in bone marrow of irradiated blood deficiency mice [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med* (山东中医药大学学报), 2005, 29(3): 236-239.
- [2] Liang Q D, Lu X Q, Ma Z C, et al. Preliminary study on hematopoietic constituents of SI-WU-TANG [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(6): 546-549.
- [3] Liang Q D. Study on Hematopoietic Constituents in Si-Wu-Tang by Chemomics Method [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Academy of Military Medical Science* (军事医学科学院博士论文) [D]. Beijing: Academy of Military Science, 2003.
- [4] Yokota S, Yanagi H, Yura T, et al. Cytosolic chaperonin is up-regulated during cell growth. Preferential expression and binding to tubulin at G(1)/S transition through early S phase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(52): 37070-37078.
- [5] Hutchins J R, Moore W J, Hood F E, et al. Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(12): 1099-1104.
- [6] Moore J D. The Ran-GTPase and cell-cycle control [J]. *Bioassays*, 2001, 23(1): 77-85.
- [7] Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6938): 456-461.

虹鱼软骨多糖的分离纯化及生物活性的研究

郭斌¹, 韩冠英², 李智^{1*}

(1. 中国医科大学基础医学院 天然药物研究室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 锦州医学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 研究虹鱼软骨多糖 (ray cartilage glycosaminoglycans, RCG) 的提取、分离与纯化方法,并初步探讨其生物活性。方法 采用盐酸胍提取、丙酮分级沉淀、膜超滤、Sephadex 凝胶柱色谱分离、纯化获得虹鱼软骨多糖,由 HPLC 确定其相对分子质量和质量分数;建立 Lewis 肺癌小鼠模型,将实验分为生理盐水 (Saline) 组、不同剂量 (500、250、125 mg/kg) 虹鱼软骨多糖组、环磷酰胺 (CTX, 60 mg/kg) 组,观察小鼠肿瘤生长情况,绘制肿瘤生长曲线,计算原发瘤与肺转移灶数抑瘤率,免疫组织化学染色计数肿瘤组织微血管密度 (MVD),采用 RT-PCR 检测肿瘤组织血管内皮生长因子 (VEGF) 基因表达。结果 经 HPLC 检测,该组分为单一多糖,其质量分数达 99% 以上。生物活性检测结果表明,与生理盐水组比较,该多糖各剂量组小鼠的肿瘤生长曲线平缓,原发瘤抑瘤率、肺转移灶数与生理盐水组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01$);与生理盐水组比较,虹鱼软骨多糖各剂量组 MVD 显著减少,VEGF mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 虹鱼软骨多糖明显抑制小鼠 Lewis 肺癌原发瘤的生长和转移,并可抑制肿瘤的血管形成。

关键词:虹鱼软骨多糖; Lewis 肺癌; 微血管密度 (MVD); 血管内皮生长因子 (VEGF)

中图分类号:R286.91; R979.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1210-05

Isolation, purification, and biological activities of ray cartilage glycosaminoglycans

GUO Bin¹, HAN Guan-ying², LI Zhi¹

(1. Department of Ethnopharmacology, Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China)

Abstract: Objective To explore the methods of extraction, isolation, purification, and biological activities of ray cartilage glycosaminoglycans (RCG). **Methods** RCG was purified by guanidine hydrochlorid extraction, acetone fractional precipitation, ultrafiltration, and Sephadex column chromatography. The purity and molecular mass of RCG were measured by means of HPLC. The model of mouse with Lewis

收稿日期:2006-01-05

基金项目:辽宁省教育厅基金资助项目 (202173371)

作者简介:郭斌 (1969—),男,辽宁锦州人,副主任药师,博士,研究方向为天然药物开发。

Tel: (0416) 4140066 E-mail: jyguobin@126.com

* 通讯作者 李智 Tel: (024) 23256666-5319 E-mail: lizhijia@263.net

lung carcinoma was made, the experimental mice were randomly divided into normal saline group, RCG (500, 250, and 125 mg/kg) groups, and CTX (60 mg/kg) group. Tumor growth states of mice were observed, tumor growth curve was described, inhibitory rates of primary tumor and number of lung metastasis focus were measured; microvessel density (MVD) was quantitated by immunohistochemistry using monoclonal antibodies of CD31; the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA was determined with RT-PCR. **Results** Using HPLC, a single glycosaminoglycans with molecular mass 9.7×10^4 was collected and its purity exceeded ninety-nine percent. Tumor growth curves in RCG groups were smooth compared with saline group. There were significant differences of inhibitory rates of primary tumor, number of lung metastasis focus and MVD between RCG groups and saline group. VEGF mRNA expression levels in RCG groups were reduced significantly compared with saline group. **Conclusion** RCG could effectively inhibit the growth and metastasis of primary Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mouse and angiogenesis.

Key words: ray cartilage glycosaminoglycans (RCG); Lewis lung carcinoma; microvessel density (MVD); vascular endothelial growth factor (VEGF)

鲎为脊椎动物门,软骨鱼纲,板鳃亚纲,鲎目(或鲎鱼目),鲎科(Dasyatidae),属暖温带底层鱼。据《本草纲目》记载“状如盘及荷叶,大者围七八尺,无足无鳞,背青腹白,口在腹下,目在额上,尾长有节,蜇人甚毒,尾有毒,主治齿痛”。鲎鱼内骨骼均为软骨,软骨是动物体内一种高度特化的致密结缔组织,主要由软骨细胞和含有胶原纤维及大量蛋白多糖的细胞外基质组成。蛋白多糖是一类由一个核心蛋白和与其共价相连的糖胺聚糖构成的复杂的高分子化合物。以往的研究表明,蛋白多糖在细胞黏附、细胞间相互交流、信息传递、调节细胞增殖与分化等方面扮演重要角色。本研究以鲎鱼软骨为原料,对存在于鲎鱼软骨中的多糖进行提取、分离与纯化,并初步探讨其生物学活性。

1 材料与方法

1.1 材料:鲎鱼购自锦州市水产公司,经锦州海洋药业研究开发中心贾玉海教授鉴定为赤鲎 *Dasyatis akajei* (Müller et Henle)。C57BL/6J 小鼠,清洁级,体重 18~22 g,中国医学科学院实验动物研究所提供,动物合格证号 SCXK(京)2004-0001。Lewis 肺癌瘤株,中国医学科学院药物研究所提供。标准相对分子质量 Dextran T 系列葡聚糖标准品,Pharmacia 公司;三氟乙酸、DMSO,Fluka 公司;CD31、血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体及免疫组化试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司;环磷酰胺(CTX),江苏恒瑞医药公司;Trizol 试剂、引物,上海生物工程技术服务有限公司;RT-PCR 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。GL-21M 型高速冷冻离心机,长沙天创仪器制造有限公司;FS010K10C 型超滤系统,美国 Pall 公

司;台式冷冻干燥机,美国 Kinetics 公司;−86 ℃ 超低温冰箱,日本三洋;相对分子质量 50 000、1 000 滤膜,美国 Pall 公司;Sephadex G-75,Pharmacia 公司;高效液相系统,Angilant 公司,高效液相泵为 BIO-RAD1330 型,柱为 Shodex KS-805。

1.2 方法

1.2.1 鲎鱼软骨多糖的提取、分离与纯化:取干燥鲎鱼软骨,加入 2 mol/L 盐酸胍,0.02 mol/L MES (2-N-吗啡啉磺酸) pH 6.0 的溶液,于室温下搅拌提取 24 h,4 000 r/min 离心分离,上清液用相对分子质量 1 000 的滤膜脱盐,再用相对分子质量 50 000 滤膜超滤,取膜上部分滤液冷冻干燥,粉末溶于双蒸水,置相对分子质量 3 500 透析膜内,对水充分透析,上清液丙酮分级沉淀,依次用 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤脱水,低温烘干得白色粉末,加适量水溶解,滴加 10% 三氟乙酸,有少量沉淀析出,4 000 r/min 离心 15 min,上清液对水透析 24 h 后,经 Sephadex G-75 凝胶柱色谱分离,蒸馏水洗脱,体积流量为 0.5 mL/min。冷冻干燥即得。

1.2.2 鲎鱼软骨多糖质量分数和相对分子质量测定:将鲎鱼软骨多糖及各种标准相对分子质量 Dextran T 系列葡聚糖标准品分别称量并溶解于双蒸水中,质量浓度为 1 mg/mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,10 000 r/min 离心 10 min,上清液进样量为 20 μL,流动相为水,体积流量 0.8 mL/min,示差检测器检测,柱温 40 ℃。记录样品及各种标准相对分子质量葡聚糖色谱曲线和保留时间。以洗脱体积 $[(V_e - V_o)/(V_i - V_o)]$, V_e 表示流经体积, V_o 表示外水体积, V_i 表示内水体积] 的值为横坐标,以相对分子质量的对数为纵坐标,绘制标准曲线。根据标

准曲线计算鲳鱼软骨多糖相对分子质量,根据峰的对称性判断质量分数。

1.2.3 鲳鱼软骨多糖对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响:取接种 Lewis 肺癌 10~14 d 的 C57BL/6J 荷瘤小鼠,脱颈椎处死,无菌条件下取瘤组织,按肿瘤质量(g)与生理盐水(mL)1:3 制备匀浆液,调整细胞数 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 备用,另取 C57BL/6J 小鼠(18~20 g) 40 只,随机分为 5 组:生理盐水(90 mg/kg)组、鲳鱼软骨多糖高、中、低剂量(500、250、125 mg/kg)组、环磷酰胺(CTX,60 mg/kg)组。各组小鼠于右腋皮下接种匀浆液,每只 0.2 mL。各组接种后第 2 天开始 ip 给药,环磷酰胺组每周 1 次,其他各组每日 1 次,连续 21 d。接种后每 3 天测量 1 次荷瘤小鼠肿瘤最长径和最短径,计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。第 21 天脱颈椎处死各组小鼠,取皮下肿块称质量,计算肿瘤生长抑制率(抑瘤率)。完整取出双肺,并在解剖显微镜下计数双肺形成的转移瘤灶数目。

肿瘤体积 = 短径² × 长径/2

抑瘤率 = (生理盐水组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 生理盐水组平均瘤质量 × 100%

1.2.4 鲳鱼软骨多糖对 Lewis 肺癌小鼠瘤组织微血管密度(MVD)的影响:取部分肿瘤组织,10% 中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋后连续切片,CD31 抗体为 I 抗,阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替 I 抗,按照试剂盒说明书进行 SABC 法免疫组化染色。CD31 阳性内皮细胞被染成棕黄色,计数时以血管密度区为准,避免硬化区和坏死区,切片中任何与周围组织明确区分的棕染内皮细胞及细胞团均按独立的微血管分别计数,是否有管腔、红细胞不作为计数血管标志。显微镜下计数 6 个视野内肿瘤微血管数目,以平均每高倍镜(×200)下视野微血管个数表示 MVD^[1]结果。

1.2.5 鲳鱼软骨多糖对 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 VEGF 表达的影响:采用 Trizol 一步法提取瘤组织总 RNA,提取的 RNA 经紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 吸光度(A)值,由 260 nm A 值计算出 RNA 浓度。按照宝生物工程(大连)有限公司 RT-PCR 试剂盒(AMV)说明进行 PCR 扩增。RT-PCR VEGF 引物为:5'-AGACAATGGGATGAAAGG-3' (sense), 5'-AGATGAGGAAGG-GTAAGC-3' (antisense),扩增片段大小为 554 bp; β -actin 引物为:5'-CCCATCTACGAGGGCTAT-3' (sense), 5'-TGTCACGCACGATTTCC-3' (antisense),扩增片段大小为 145 bp。反转录反应参数设

置如下:42 °C、30 min, 99 °C、5 min; 然后进行 30 个周期的 PCR 扩增反应,PCR 扩增反应参数设置如下:94 °C、2 min 预变性 1 个循环,每个周期为 94 °C、变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min。取 PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙啶染色,电泳条带经电泳图像分析扫描仪扫描,得到 VEGF 与 β -actin 条带的各自峰面积积分值,以 VEGF 与 β -actin 比值作为 VEGF 表达参数,对 VEGF PCR 产物相对定量。

1.2.6 统计学分析:采用 SPSS 统计软件包,多组样本均数比较采用方差分析(AVONA)。

2 结果

2.1 鲳鱼软骨多糖质量分数和相对分子质量:以洗脱体积 $(V_e - V_o)/(V_i - V_o)$ 的值为横坐标,以相对分子质量的对数为纵坐标,得标准曲线,曲线方程 $Y = -3.5349X + 6.3794, r = 0.9987$ 。该组分在 HPLC 中呈现单一对称峰,表明其为均一多糖组分。从峰面积计算其质量分数达 99% 以上。由其洗脱时间 16.40 min,从标准曲线上求得其相对分子质量为 9.7×10^4 。该多糖在水中极易溶解,高浓度时为黏稠胶体,其 0.5% 水溶液测得比旋光度 $[\alpha] = +51.8^\circ$ 。

2.2 鲳鱼软骨多糖对荷 Lewis 肺癌小鼠的影响:用药 21 d 后,鲳鱼软骨多糖各剂量组瘤质量均显著低于生理盐水组 ($P < 0.01, 0.05$),高、中、低剂量组小鼠原发瘤抑制率分别为 43.36%、26.34%、15.10%。鲳鱼软骨多糖对荷 Lewis 肺癌肺转移的影响实验结果表明,生理盐水组肺转移灶形成大而且多,有的甚至融合成大的融合灶,鲳鱼软骨多糖各剂量组肺转移灶小而少,差异非常显著 ($P < 0.01$),结果见表 1。从各组移植瘤生长曲线来看,生理盐水组生长曲线陡直,鲳鱼软骨多糖各剂量组生长曲线位于生理盐水组下方,且高、中剂量鲳鱼软骨多糖组曲线平缓,结果见图 1。表明鲳鱼软骨多糖对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移具有明显的抑制作用。

2.3 鲳鱼软骨多糖对荷 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 MVD 的影响:镜下结果和统计分析表明,与生理盐水组比较,鲳鱼软骨多糖各剂量组 Lewis 肺癌瘤组织 MVD 明显减小,差异非常显著 ($P < 0.01$)。结果见表 2。说明鲳鱼软骨多糖可抑制 Lewis 肺癌原发瘤组织微血管形成。

2.4 鲳鱼软骨多糖对 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 VEGF mRNA 表达的影响:RNA 经紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm A 值的比值均为 1.8~

表 1 虹鱼软骨多糖对荷 Lewis 肺癌小鼠瘤质量及肺转移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of RCG on weight of tumor and numbers of metastasis focus in mice with Lewis lung carcinoma ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%	肺转移灶/个
生理盐水	--	4.29±0.60	—	14.14±2.12
虹鱼软骨多糖	500	2.43±0.72**	43.36	5.38±2.69**
	250	3.16±0.54**	26.34	7.13±2.90**
	125	3.55±0.65*	15.10	9.88±2.36**
CTX	60	1.60±0.34**	62.70	0.13±0.35**

与生理盐水组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs saline group

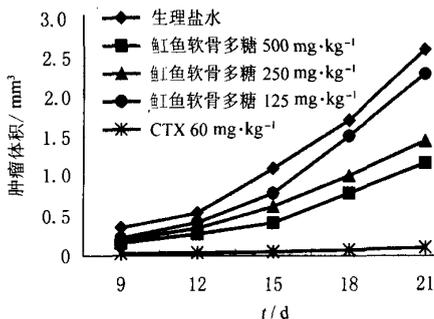


图 1 虹鱼软骨多糖对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长的影响

Fig. 1 Effect of RCG on growth of Lewis lung carcinoma in mice

表 2 虹鱼软骨多糖对荷 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 MVD 和 VEGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of RCG on MVD and VEGF mRNA expression in tumor tissue of mice with Lewis lung carcinoma ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MVD (n=6)	VEGF mRNA 表达 (VEGF/β-actin, n=8)
生理盐水	--	40.50±2.17	1.09±0.05
虹鱼软骨多糖	500	18.83±5.95**	0.53±0.02**
	250	23.17±6.37**	0.58±0.01**
	125	25.33±6.77**	0.92±0.02**
CTX	60	29.80±2.96**	0.61±0.02**

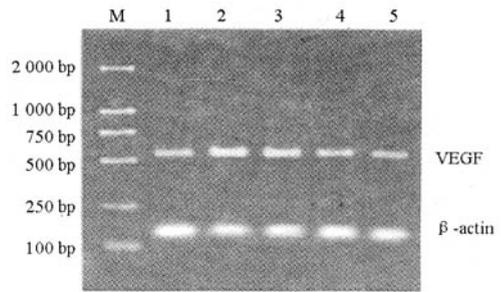
与生理盐水组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs saline group

2.0. 与生理盐水组比较,虹鱼软骨多糖各剂量组荧光强度逐渐降低。结果见图 2。各用药组 VEGF 灰度与 β-actin 内参灰度比值较生理盐水组明显减少,差异显著 (P<0.01)。结果见表 2。表明虹鱼软骨多糖对 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 VEGF mRNA 表达具有抑制作用。

3 讨论

血管生成 (angiogenesis) 与肿瘤的生长和转移关系密切,以肿瘤血管为靶点抗血管生成是目前肿



M-Marker 1-CTX 2-生理盐水

3~5-虹鱼软骨多糖 (125、250、500 mg/kg)

M-Marker 1-CTX 2-normal saline

3~5-RCG (125, 250, and 500 mg/kg)

图 2 虹鱼软骨多糖对 Lewis 肺癌小鼠瘤组织 VEGF mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of RCG on VEGF mRNA expression in tumor tissue of mice with Lewis lung carcinoma

瘤治疗研究领域的热点课题^[2]。在胚胎发育时期生物个体软骨中含有血管,而在个体出生后软骨中血管消失,并仍可抵御新生血管入侵,推测软骨组织中可能含有某种物质能抑制新生血管生成。1983 年, Lee 和 Langer 首先发表了鲨鱼软骨含有抗肿瘤血管增生成分的研究论文^[3],开创了软骨抗肿瘤研究的先河。

本实验从虹鱼软骨提取多糖成分,经高效液相色谱法测定其为相对分子质量 9.7×10^4 的单一多糖。选择 Lewis 肺癌作为研究模型,是因为 Lewis 肺癌为自发性肺内未分化上皮样癌,其移植后的增殖、侵袭、转移基本类似于人类肿瘤从生长到移植形成的全部过程。生物活性研究结果表明,应用虹鱼软骨多糖可使荷 Lewis 肺癌的 C57BL/6J 小鼠肿瘤体积生长曲线平缓,原发瘤抑瘤率增加,肿瘤肺转移灶减少,且具有剂量依赖性。采用免疫组织化学方法检测肿瘤 MVD,定量肿瘤血管,能反映肿瘤血管生成情况,且可预测肿瘤转移、复发和预后^[4]。虹鱼软骨多糖的各剂量组 MVD 均低于生理盐水组,表明虹鱼软骨多糖在一定程度上能抑制 Lewis 肺癌的微血管形成。

VEGF 是目前发现的最重要的促血管生成因子,能增加微血管的通透性,促进不同来源的内皮细胞分裂、增殖、迁移和血管构建。VEGF 在包括肺癌在内的多种肿瘤中有较高表达,在肿瘤发生、转移过程中发挥重要作用,可作为肿瘤的一个独立可靠的预后因素。本研究表明,虹鱼软骨多糖在基因水平上抑制了肿瘤组织 VEGF 表达,抑制了肿瘤血管形

成,进而抑制了肿瘤的生长和转移。

现代医学认为,肿瘤的侵袭与转移是一个多因素参与、多步骤的复杂过程。抗血管生成仅是鲨鱼软骨多糖抑制肿瘤生长和转移的机制之一,本课题组将进一步筛选对鲨鱼软骨多糖敏感瘤株,并深入探讨其抗肿瘤作用机制。

References:

[1] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and oth-

er solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169-180.

[2] Eatock M M, Schatzlein A, Kaye S B. Tumor vasculature as a target for anticancer therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2000, 26(3): 191-204.

[3] Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis [J]. *Science*, 1983, 221 (4616): 1185-1187.

[4] Tanaka F, Oyanagi H, Takenaka K, et al. Glomeruloid microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(20): 6791-6794.

樟柳碱在 Beagle 犬血清中的药动学研究

黄莹^{1,2}, 只德广², 徐为人², 刘昌孝²

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所, 天津 300192; 2. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 建立高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 测定 Beagle 犬血清中樟柳碱的分析方法。方法 采用沉淀及萃取相结合的方法提取样品, LC-MS 分析方法, 选择负离子测定模式, 测定 Beagle 犬单剂量 iv 樟柳碱 0.2 mg/kg 后樟柳碱的血药浓度。结果 该方法线性、回收率和重现性良好, 批内、批间变异系数均在 10% 以内, 样品提取后 24 h 内稳定, 灵敏度可达到 1 ng/mL, 出峰时间为 3.1 min, C_{max} 为 (145.07 ± 32.63) ng/mL, t_{max} 为 (0.04 ± 0.06) h, $AUC_{(0-t)}$ 为 (361.10 ± 26.01) mg · h/mL, CL 为 (5.56 ± 0.41) L/h, $t_{1/2}$ 为 (1.67 ± 0.34) h, Vd 为 (13.39 ± 3.05) L。结论 此方法简便、快速, 专属性强, 灵敏度高, 能够准确测定血中氢溴酸樟柳碱, 有实际意义。

关键词:樟柳碱; 高效液相色谱-质谱联用; 药动学; 血药浓度

中图分类号:R285.61 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)08-1214-04

Pharmacokinetics of anisodine in Beagle dogs serum by LC-MS

HUANG Ying^{1,2}, ZHI De-guang², XU Wei-ren², LIU Chang-xiao²

(1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; 2. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Key words: anisodine; LC-MS; pharmacokinetics; drug concentration

莨菪类药物樟柳碱 (anisodine) 是从茄科植物山莨菪 *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher 根中提取得到的一种生物碱, 为 M 胆碱受体阻断剂, 其化学结构和东莨菪碱相似, 药理作用类似于阿托品类化合物, 具有较强的中枢和外周抗胆碱活性, 也有解除血管痉挛, 改善微循环, 解痉、平喘、抑制唾液分泌, 散瞳, 对抗有机磷中毒等作用, 其毒性比同类药物山莨菪碱、阿托品、山莨菪低^[1]。目前临床上主要用氢溴酸樟柳碱治疗眼部缺血性疾病、视神经病变及全身性血管病的眼底病变^[2~4]。由于樟柳碱的剂量低, 导致用药后血药浓度极低, 目前已报道的樟柳碱的分析方法有高效液相色谱法^[5,6]、高效毛细管

电泳法、导数光谱法等^[7,8], 但这些方法均无法准确地对其进行检测。本实验以 LC-MS 研究了 Beagle 犬血清中樟柳碱的测定方法, 同时研究了 Beagle 犬 iv 后的药动学过程。

1 材料

1.1 试剂: 甲醇, 南开大学精益教育技术装备公司; 乙腈, 天津市康科德科技有限公司; 去离子水, 天津半导体研究所; 三氯乙酸 (TCA), 如皋市化学试剂厂; 三乙胺, 天津市化学试剂批发公司产品; 生理盐水, 大冢制药有限公司。

1.2 试验药品: 氢溴酸樟柳碱 (以下简称樟柳碱) 由北京紫竹药业有限公司提供; 样品用前以生理盐