

- [8] Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. *Analyt Biochem*, 1981, 112(1): 70-75
- [9] Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma [J]. *Biochem Med*, 1976, 15: 212-216
- [10] Kleiner D E, Stellerstevenson W G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases [J]. *Analyt Biochem*, 1994, 218(2): 325-329
- [11] Bhogal R K, Bona C A. B cells: no longer bystanders in liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(11): 2962-2965
- [12] 刘平, 方步武, 刘成, 等. 转化生长因子 β_1 及虫草多糖对大鼠肝纤维化形成的影响 [J]. 中华肝病杂志, 1998, 6(4): 232-234
- [13] 王爱民, 王宝恩, 杨跃伟, 等. 实验性肝纤维化明胶酶 A 基因表达的研究 [J]. 中华医学杂志, 1999, 79(5): 394-395
- [14] Takahara T, Furui K, Funaki J, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in experimental liver fibrosis in rats [J]. *Hepatology*, 1995, 21: 787-795
- [15] Galli A, Sveglia B, Baroni G, Ceni E, *et al.* Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2 mediated mechanism [J]. *Hepatology*, 2005, 41(5): 1074-1084

当归多糖铁复合物在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内药动学比较研究

刘金玉¹, 张玉², 王凯平^{1*}, 李石军², 刘茂昌¹, 曾芳¹

(1 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030; 2 华中科技大学同济医学院协和医院 药剂科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 比较当归多糖铁复合物 (APIC) 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学差异, 为优化临床给药方案提供参考。方法 采用低铁饲料并辅以定期放血法建立缺铁性贫血模型, 缺铁性贫血大鼠与正常大鼠分别随机分为 APIC 低、中、高剂量 (5.83, 8.75, 17.5 mg/kg) 组, ig 给药, 以原子吸收法测定各时间点血清铁浓度, 用 DAS 2.0 软件求算药动学参数, 并采用 SPSS 13.0 软件对同剂量组的缺铁性贫血大鼠和正常大鼠的主要药动学参数进行 *t* 检验。结果 APIC 在两种不同生理状况下大鼠的药动学过程均符合二室模型, 3 个剂量组的缺铁性贫血大鼠的血清铁浓度在 4 h 以后均显著高于健康大鼠, 3 个剂量组的 CL/F 、 $t_{1/2\beta}$ 与正常组均有显著差异 ($P < 0.05$), 但只有高剂量组的 $t_{1/2\alpha}$ 与正常组有显著差异。结论 APIC 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学存在显著差异, 并且这种差异与剂量有一定的关系。

关键词: 当归多糖铁复合物; 药动学; 缺铁性贫血

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1672-05

In vivo pharmacokinetic comparison of *Angelica sinensis* polysaccharide iron complex in iron deficiency anemia rats and normal rats

LIU Jir-yu¹, ZHANG Yu², WANG Kai-ping¹, LI Shi-jun², LIU Mao-chang¹, ZENG Fang¹

(1 School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

2. Department of Pharmacy, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To study the pharmacokinetic differences of *Angelica sinensis* polysaccharide iron complex (APIC) in iron deficiency anemia (IDA) rats and normal rats. **Methods** The IDA model rats were established by feeding iron deficiency diet and periodic bleeding, IDA rats and normal rats were randomly divided into three groups, respectively. In APIC low, medium, and high (5.83, 8.75, and 17.5 mg/kg) dosage groups, serum iron concentration was assayed by atomic absorption spectrometry after ig administration of APIC, the pharmacokinetic parameters were analyzed by DAS 2.0 software. The statistical test was carried out by SPSS 13.0 to compare the main pharmacokinetic parameters (*t*-test) between IDA rats and normal rats of the same dosage. **Results** The concentration-time curves of APIC in all groups were fitted to two-compartment open model. Marked differences of iron concentration in serum were found 4 h after administration between IDA rats and normal rats, the serum iron concentration in IDA rats was significantly higher than that in normal rats ($P < 0.05$). In low, medium, and high dosage groups $t_{1/2\beta}$ of the IDA rats was significantly longer than that of the normal rats, but there was marked

①收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目 (2008CDA064)

作者简介: 刘金玉 (1985—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要研究药物新剂型及其生物有效性。

Tel: 15871397942 E-mail: cherrylianyu@163.com

* 通讯作者 王凯平 Tel: (027) 63559222 E-mail: wkpzq@163.com

difference of $t_{1/2\alpha}$ only in high dosage, CL/F of the IDA rats was significantly lower than that of the rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Data indicates there are significant differences in APIC pharmacokinetics between IDA rats and normal rats, and the differences have a little relationship on the dosage.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide-iron complex (APIC); pharmacokinetics; iron deficiency anemia (IDA)

多糖铁复合物 (polysaccharide-iron complex, PIC) 是以生物大分子多糖为配体的铁剂, 不仅具有理想的配合性, 有效避免了游离亚铁离子刺激胃肠道所产生的消化道不良反应, 并且当其释放铁之后配体多糖具有多方面的生物活性, 可被吸收利用, 因而成为目前研究的热点^[1-2]。以力蜚能 (Niferex) 为代表的多糖铁复合物制剂迅速进入临床应用阶段^[3], 与现在的补铁剂相比, 副作用小, 补铁效果好; 有很好的造血功能, 可迅速提高血红素水平, 是比较理想的铁补充剂^[4]。

本课题组以当归多糖和三氯化铁为主要原料合成当归多糖铁复合物 (*Angelica sinensis* polysaccharide-iron complex, APIC), 其合成条件温和, 工艺简单; APIC 质量分数可达 99% 以上, 水溶性好, 热稳定性好, 体内吸收快、消除慢^[5]; 前期实验已考察了 APIC 对溶血大鼠和缺铁性贫血大鼠的疗效^[6-7], 结果表明 APIC 对大鼠贫血状态的改善较力蜚能更好, 且机体铁代谢的相关指数水平也更接近正常水平。本实验比较 APIC 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学差异, 为临床给药方案提供参考。

1 材料

1.1 仪器、试剂与药品: SpectrAA—240 FS 原子吸收光谱仪 (美国 Varian), TGL—16 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), CD—1700 全自动血液分析仪 (美国雅培公司)。APIC (自制), 牛血清标准参考物质 [中国预防医学科学院环境卫生监测所, 含铁量 (1.57 ± 0.24) mg/L], 铁元素标准溶液 (国家标准物质研究中心, 标准值 1 000 g/L), 其他所用试剂均为分析纯, 实验用水为双蒸水。

1.2 实验动物: SD 大鼠 48 只, 雄性, 体质量 (200 ± 20) g, 由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。

1.3 低铁饲料: 参考美国分析化学家协会 (AOAC) 推荐的低铁饲料配方配制低铁基础饲料。本实验以玉米淀粉 (等量玉米粉和玉米渣混合) 为主要成分配制低铁基础饲料, 配方如下: 玉米淀粉约 99%, 食盐约为 0.7%, 氯化胆碱约 0.1%, 混合维生素约

0.1%, 微量元素的 0.1%, 其平均含铁量为 10.4 mg/kg。

2 方法与结果

2.1 APIC 的制备: 称取当归多糖 2.0 g、柠檬酸钠 0.5 g, 溶于 60 mL 蒸馏水中, 置 70 °C 水浴中搅拌。调节 pH 值为碱性, 再缓缓加入 2 mol/L 三氯化铁溶液, 当反应液中出现红棕色不溶沉淀时, 立即停止滴加三氯化铁溶液, 继续搅拌 1 h, 停止搅拌后趁热离心, 得深红棕色上层液体, 加入约两倍量的无水乙醇, 稍稍振荡, 溶液中出现有红棕色物质, 静置使沉淀, 倾去上层淡黄色透明液体, 滤过, 所得沉淀干燥, 得 APIC 约 2.0 g。按照《中国药典》2005 年版对 APIC 中的铁与多糖进行定量检测, 含铁量为 33.7%, 含多糖量为 12.5%。

2.2 血清铁测定方法的建立

2.2.1 原子吸收光谱条件: 元素-基体为 Fe; 仪器类型为火焰; 火焰类型为空气-乙炔; 空气流量 13.50 L/min; 乙炔气流量 2.00 L/min; 波长 248.3 nm; 狭缝 0.2 nm; 灯电流 5.0 mA; 灯位 4。

2.2.2 血样处理: 所取血样离心 (8 000 r/min, 10 min), 取上层血清 0.2 mL 用双蒸水稀释至 2 mL, 混合均匀, 待测。

2.2.3 标准曲线的制备: 取 6 只 10 mL 试管, 每管中加入标准牛血清 0.2 mL, 每份中各加入不同体积铁标准溶液 (1 000 g/L), 用双蒸水稀释至 5 mL, 配成质量浓度相当于 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/L 的血清标准品溶液, 测定吸光度 (A) 值, 以 A 值为纵坐标, 对应的质量浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程: $C = 0.0548A + 0.0005$, $r = 0.9992$ 。

2.2.4 准确性试验: 牛血清标准物质中含铁量为 (1.57 ± 0.24) mg/L, 按本实验方法条件测定牛血清标准物质中含铁量, 测定值为 (0.1546 ± 0.01) mg/L ($n = 5$), RSD 为 6.57%, 实验方法可靠。

2.2.5 精密度试验: 取牛血清标准物质 15 份, 各加入一定量的铁标准溶液, 配成高、中、低 3 种质量浓度 (0.9、0.6、0.15 mg/L) 的血清铁标准品溶液, 每种质量浓度 5 份。分别在同一日内测定和连续

5 d 内测定, 计算日内精密度和日间精密度, 日内精密度 RSD 分别为 0.9%、5.1%、5.8% ($n=5$), 日间精密度 RSD 分别为 6.4%、8.6%、6.9% ($n=5$), RSD 均小于 15%, 符合国家对生物样品测定的要求。

2.2.6 回收率试验: 取牛血清标准物质 15 份, 各加入一定量的铁标准溶液, 配成低、中、高 (0.2、0.4、0.8 mg/L) 3 种质量浓度的血清标准品溶液, 每种质量浓度 5 份, 按 2.2.1 条件测定 A 值, 依据标准曲线计算检测量。以检测量与加入量的比值计算相对回收率。上述 3 种质量浓度回收率在 96.5%~114.7% ($n=5$), 说明该法具有较好的准确度, 符合分析要求。

2.3 缺铁性贫血大鼠模型的建立^[8,9]: 挑选血象正常的大鼠, 眼眶静脉取血测血清铁 (SI)。称体质量, 分养于塑料笼内, 室内温度为 $(20\pm2)^{\circ}\text{C}$, 饲以低铁饲料, 自由饮用双蒸水, 每隔一天眼眶静脉放血 1~1.5 mL。每周称体质量并定时测量血清铁浓度, 待血清含铁量减半时, 采用血细胞自动分析仪测定血红蛋白 (Hb)、红细胞压积 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白量 (MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC) 及红细胞体积分布宽度 (RDW)。整个试验过程中严格避免铁污染。造模大鼠的一般状态: 缺铁组的大鼠在第 2 周开始出现皮肤苍白, 皮毛粗糙、稀疏、容易脱落, 体质量开始下降, 耳、脚爪出现明显苍白, 表现稍烦躁, 喜欢咬木盖子, 甚至互相伤残, 并随着实验时间的延长, 上述症状更加明显。造模至 1 个月, 采用血细胞

自动分析仪测定血液中各指标, 结果见表 1。可见, 模型建立前后相比较, 大鼠 Hb、HCT、MCV、MCH 及 MCHC 均显著下降, RDW 增加, 对实验数据进行 t 检验, 各项指标均具有统计学意义, 表明造模组大鼠具有明显的缺铁性贫血症状, 缺铁性贫血模型构建成功。

2.4 动物分组与实验: 缺铁性贫血模型大鼠 21 只, 健康大鼠 21 只分别随机分成低、中、高剂量 (剂量以药物所含铁的量为标准, 分别为 5.83、8.75、17.5 mg/kg) 组, 禁食 12 h, 整个实验过程中不禁水, 各组分别 ig APIC 溶液。分别在给药前及给药后 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7 h 从大鼠眼眶静脉取血^[10] 0.5 mL, 放置 30 min 后按“血样处理”项下处理。

2.5 药动学数据处理结果, 以各时间点血清铁浓度 (减去零时刻血清铁浓度的净增值) 为纵坐标, 时间为横坐标绘制平均血清铁浓度-时间关系曲线, 见图 1。应用 DAS 2.0 软件对血清铁浓度-时间数据进行处理, 经 F 检验拟合优度, 铁浓度拟合值与实测值相关性良好, AIC 最小原则作为判别标准^[11], 计算药动学参数。结果表明, APIC 在缺铁性贫血模型大鼠与正常大鼠体内药动学过程均符合二室模型, 其主要药动学参数见表 2。采用 SPSS 13.0 对同剂量组模型大鼠与正常大鼠的主要药动学参数 t 检验后发现: 3 个剂量组的模型大鼠的血清铁浓度在 4 h 以后均显著高于正常大鼠 ($P<0.05$), 3 个剂量组的 $t_{1/2\beta}$ 均显著大于正常大鼠 ($P<0.05$), 但只有高剂量组的 $t_{1/2\alpha}$ 显著大于正常大鼠 ($P<0.05$),

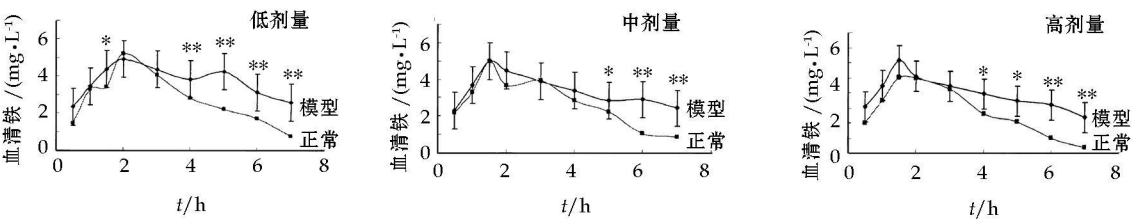
表 1 大鼠造模前后血常规及体质量变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=21$)

Table 1 Changes in hematological indices and body weight of rats before and after modeling ($\bar{x}\pm s$, $n=21$)

时 间	Hb/(g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/fg	MCHC/(g·L ⁻¹)	RDW	SI/(mg·L ⁻¹)	体质量/g
造模前	139.20±9.15	45.16±3.13	65.86±1.42	20.34±0.54	308.40±3.91	34.06±0.63	3.90±0.85	207.20±25.40
造模后	107.80±7.79***	38.08±2.66***	56.34±3.86***	15.96±3.86***	283.20±8.67***	39.50±7.45	1.32±0.93***	170.70±25.70***

与造模前比较: *** $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs premodeling



与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group

图 1 血清铁浓度-时间关系曲线 ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

Fig. 1 Mean serum iron concentration time curves ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

表 2 大鼠 ig APIC 的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)Table 2 Pharmacokinetic parameters of APIC after ig administration in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

参 数	单 位	低剂量组		中剂量组		高剂量组	
		正 常	缺铁性贫血	正 常	缺铁性贫血	正 常	缺铁性贫血
$t_{1/2\alpha}$	h	1.03 ± 0.23	2.09 ± 0.78	1.02 ± 0.36	1.96 ± 1.58	0.82 ± 0.17	2.04 ± 1.69*
$t_{1/2\beta}$	h	1.32 ± 0.20	3.38 ± 1.09*	1.60 ± 0.81	4.46 ± 2.14*	1.07 ± 0.18	4.50 ± 1.54**
VL/F	L · kg ⁻¹	0.22 ± 0.32	1.74 ± 0.83	0.60 ± 0.58	1.18 ± 0.55	0.62 ± 0.60	0.68 ± 0.06*
CL/F	L · h ⁻¹ · kg ⁻¹	0.38 ± 0.13	0.29 ± 0.10*	0.41 ± 0.09	0.20 ± 0.10*	0.80 ± 0.12	0.13 ± 0.02**
AUC _(0-t)	mg · h · L ⁻¹	18.10 ± 5.13	25.40 ± 2.09*	18.60 ± 4.26	23.60 ± 5.88	19.10 ± 2.29	27.50 ± 3.81*
$t_{1/2K_a}$	h	0.62 ± 0.20	0.64 ± 0.38	0.58 ± 0.26	0.62 ± 0.24	0.57 ± 0.29	0.51 ± 0.08
t_{max}	h	2.20 ± 0.45	1.70 ± 0.45	2.00 ± 0.61	1.60 ± 0.22	1.80 ± 0.27	1.50 ± 0.00
C_{max}	μg · mL ⁻¹	5.27 ± 1.36	5.10 ± 0.48	5.62 ± 0.76	5.10 ± 1.61	5.91 ± 0.84	6.13 ± 0.90

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group

3 个剂量组的 CL/F 均小于正常组大鼠 ($P < 0.05$)。说明 APIC 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学过程存在显著差异, 并且这种差异与剂量有一定的关系。

3 讨论

本实验采用低铁饲料喂养, 辅以定期少量放血建立缺铁性贫血模型, 并对此模型大鼠的一般形态, 各项指标与造模前比较, 从而说明缺铁性贫血模型的建立。这种方法比单纯低铁饮食或单纯放血等方便快捷准确。

实验表明 APIC 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学过程有显著差异。高、中、低剂量缺铁性贫血大鼠的 $t_{1/2\beta}$ 均显著大于正常大鼠, 血清铁浓度在 4 h 以后还保持在较高水平, AUC 也显著大于正常大鼠, 而 CL/F 小于正常大鼠, 这样可长时间维持体内对铁的需求。研究表明: 机体主要是通过控制铁吸收来维持体内的铁稳态, 而铁吸收率主要是受机体铁储量及造血速度影响^[12]。在缺铁状态时, 机体通过各个方面提高铁吸收率满足机体的铁需求: 在正常情况下, 铁的吸收主要是在十二指肠和空肠上段, 但缺铁状态时, 空肠远端也可吸收^[12], 这在一定程度上可延长吸收时间; 缺铁性贫血大鼠的胃肠蠕动加强, 肠组织铁的量显著降低, cAMP/cGMP 大于正常组, 肠收缩功能亢进, 肠推进率增大^[13-14], 这在一定程度上可提高吸收速率; 大鼠缺铁贫血时 EPO 生成增加, hepcidin 表达减少, 十二指肠基底膜侧 TfR 表达随之升高^[15-16], 铁从肠道细胞内经基底膜转运至细胞外间隙增多, 十二指肠细胞内铁浓度降低, 从而促进肠铁吸收。铁进入肠黏膜细胞后有两个去向: 一是与细胞内的转铁蛋白结合, 进入血管; 二是与胞内去铁蛋白结合形成铁蛋白, 贮存于细胞浆中。细胞内铁蛋白的合成受铁调节, 铁的量低

抑制其合成, 使得与去铁蛋白结合的铁量减少而进入血管内的铁量增加^[17-18], 这也与清除率减少一致。

3 个剂量组的 APIC 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠的药动学差异方向是一致的, 但程度上存在差别。3 个剂量组缺铁性贫血大鼠的 $t_{1/2\beta}$ 、AUC 均大于正常大鼠, 但 $t_{1/2\alpha}$ 只在高剂量组有显著差异, AUC 在高、低剂量组有差异, 这种差异与剂量的具体关系还需进一步研究。

本实验只对缺铁性贫血大鼠与健康大鼠的药动学过程进行了比较, 对于不同程度缺铁性贫血大鼠的药动学过程还需进一步研究。

参考文献:

- [1] London E. The molecular formula and structure of the iron dextrin complex, Imferon [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(7): 1838-1846
- [2] 王宝琴, 徐泽平, 刘雪红. 多糖铁复合物的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23): 7044-7046
- [3] 李玉贤, 裴晓红. 大枣多糖铁(III)配合物的合成及一般性质研究 [J]. 中成药, 2006, 28(5): 707-709
- [4] 李白强. 力蜚能治疗消化性溃疡出血所致缺铁性贫血的疗效观察 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 9(17): 111-112
- [5] 王凯平, 张 玉, 戴立泉, 等. 当归多糖铁的溶出度和生物利用度的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 377-380
- [6] 张 玉, 王凯平, 王佩佩, 等. 当归多糖铁治疗溶血性小鼠的实验研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1652-1654
- [7] 王凯平, 陈志祥, 张 玉, 等. 当归多糖铁复合物治疗缺铁性贫血大鼠的实验研究 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(7): 413-416
- [8] Lei M, Xue C H, Wang Y M, et al. Effect of squid ink melanin Fe on iron deficiency anemia remission [J]. *J Food Sci*, 2008, 73(8): 207-211
- [9] Burkhard M J, Brown D E, McGrath J P. Evaluation of the erythroid regenerative response in two different models of experimentally induced iron deficiency anemia [J]. *Veter Clin Pathol*, 2001, 30(2): 76-85
- [10] 孙 伟, 马 霖, 刘雅丽. 多糖铁胶囊的人体生物等效性研究 [J]. 中国药房, 2004, 15(3): 167-168
- [11] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000
- [12] 吕金荣. 微量元素铁与人体健康 [J]. 微量元素与健康研究,

- 2006, 23(3): 63-64
- [13] 任文海, 王新增, 王振华, 等. 缺铁对大鼠胃粘膜血流量的影响机制 [J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(10): 893
- [14] 任文海, 王新增, 王振华, 等. 缺铁性贫血大鼠小肠推进功能的改变及其相关机制的研究 [J]. 华人消化杂志, 1998, 6(12): 1030-1032
- [15] Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, *et al.* Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4596-4601
- [16] 左文丽, 刘玉峰, 张传新. 缺铁大鼠肠道黏膜细胞 IRP2 mRNA、TfR mRNA 和 Fn mRNA 表达水平的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(4): 230-231
- [17] Frazer D M, Anderson G J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 30(3): 288-297
- [18] Umbreit J N, Conrad M E, Moore E G, *et al.* Iron absorption and cellular transport; the mobilferrin/Paraferritin paradigm [J]. *Semin Hematol*, 1998, 35: 13-26

二苯乙烯苷对脑缺血再灌注大鼠神经生长因子表达及神经细胞凋亡的影响

杨 杰, 周芝文, 杨期东, 曾 进, 郑丽君*
(中南大学湘雅医院 神经内科, 湖南 长沙 410008)

摘 要:目的 探讨二苯乙烯苷 (TSG) 对缺血再灌注大鼠的神经保护作用及分子机制。方法 线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型, 再灌注后 6 h、24 h、48 h、7 d 观察动物神经行为学变化并评分, 采用原位末端脱氧核苷酸转移酶标记法 (TUNEL) 检测神经细胞凋亡; 免疫组化法检测神经生长因子 (NGF) 蛋白表达。结果 神经功能评分显示模型组各时间点均有明显的神经功能缺损症状, 除 6 h 时间点外, 两个剂量 TSG 治疗组其余各时间点神经功能评分明显低于模型组, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 除 7 d 时间点外, 两个剂量 TSG 组其余各时间点凋亡细胞数均减少, 差异非常显著 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 两个剂量 TSG 组各时间点 NGF 表达均升高, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。结论 TSG 能够增加脑缺血再灌注大鼠缺血周边区 NGF 蛋白表达, 拮抗神经细胞凋亡, 改善神经功能。

关键词: 二苯乙烯苷; 脑缺血再灌注; 神经生长因子; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1676-04

经典理论认为中枢神经系统损伤后不能再生, 但目前研究证实当给损伤的中枢神经提供适当的条件后也可再生, 从而认识到脑缺血的治疗和预防是可行的。研究发现在脑缺血损伤早期应用药物提高脑内神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 的表达水平, 对神经再生和功能的恢复具有积极意义^[1]。亦有研究明确 NGF 对细胞凋亡具有抑制作用。二苯乙烯苷 (2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷, tetrahydroxystilbene glucoside, TSG) 是中药何首乌的活性成分^[2-3]。现代药理学研究证明, TSG 具有抗氧化、抗衰老、增强免疫、调节血脂、抗动脉粥样硬化、提高学习记忆能力、抗炎、抗肿瘤、护肝、刺激黑色素合成以及诱导 AD 小鼠内源性 NGF 增加的作用^[4-9], 而 TSG 对脑缺血后 NGF 表达及神经细胞凋亡影响的研究未见报道。本研究旨在观察 TSG 对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血周边区

NGF 表达及神经细胞凋亡的影响, 从而为临床脑保护剂的研制和开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与仪器: TSG 由湖南中医研究所制剂室提供, 经高效液相色谱法提取分离、纯化, 测定其质量分数为 70%, 4℃ 冰箱保存, 临时制备成 12、24 mg/mL 溶液备用。TUNEL 试剂盒购自德国 Roche 公司。兔抗鼠 NGF 抗体购自 Millipore 公司; 兔 SABC 浓缩型免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物工程有限公司。恒低温组织切片机购自美国 AO 公司; 生物光学显微镜照相机购自日本 Olympus; HPIAS-1000 彩色病理图像分析系统购自武大影像工程公司。

1.2 实验动物分组与给药: 清洁级雄性 SD 大鼠 96 只, 体质量 200~300 g (购自湖南农业大学实验

①收稿日期: 2010-01-15

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (08JJ3083)

作者简介: 杨 杰 (1965-), 女, 湖南省长沙市人, 副教授, 博士, 主要研究方向为脑血管疾病。

Tel: 13755138437 E-mail: yangjie6523@163.com