

丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠学习记忆能力及神经再生的影响

鞠爱春^{1,3}, 耿诗涵², 杨欣鹏², 国大亮², 庄朋伟^{2*}, 周大铮^{1,3*}, 李德坤^{1,3}, 张艳军²

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402

2. 天津中医药大学 中药药理学重点实验室, 天津 300193

3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

摘要: **目的** 考察丹酚酸 B 鼻腔给药后在大鼠海马组织的分布及鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠学习记忆能力的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法** 采用高效液相色谱法检测鼻腔给药后不同时间大鼠海马组织丹酚酸 B 的浓度; 采用四动脉结扎法复制大鼠脑缺血模型, 随机分为假手术组、模型组、丹酚酸 B 鼻腔给药组, 于脑缺血后 1 周开始给药, 每天 1 次, 连续 3 周。采用 Morris 水迷宫方法, 考察丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠空间学习记忆能力的影响。采用甲酚紫 (尼氏) 染色法, 考察丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠海马区形态学特征的影响。采用 BrdU 标记及免疫组织化学法考察丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠海马区新生神经细胞存活的影响。**结果** 脑内药物浓度测定结果显示丹酚酸 B 鼻腔给药可在海马组织有一定分布, 其峰浓度 ($C_{\max}$) 为 $(2.47 \pm 0.55) \mu\text{g/g}$, 曲线下面积 (AUC) 为 $(336.4 \pm 73.0) \mu\text{g} \cdot \text{min/g}$; Morris 水迷宫实验结果显示丹酚酸 B 鼻腔给药可以降低脑缺血损伤大鼠的平均逃避潜伏期, 延长脑缺血损伤大鼠在原平台象限停留时间 ($P < 0.05$), 增加脑缺血损伤大鼠跨越原平台次数 ($P < 0.05$)。形态学结果显示模型组大鼠海马 CA1 区细胞层数减少, 锥体细胞数目明显减少, 且排列不规则; 与模型组比较, 丹酚酸 B 鼻腔给药组海马形态结构清晰, 神经细胞排列较规则, 神经元数目明显增多; BrdU 标记结果显示脑缺血损伤稳定后假手术组和模型组 BrdU 阳性细胞数目无明显变化, 但丹酚酸 B 鼻腔给药组 BrdU 阳性细胞数目显著增多 ($P < 0.01$)。**结论** 丹酚酸 B 鼻腔给药可在海马组织有一定的药物分布, 可以明显改善脑缺血损伤导致的学习记忆能力, 这种作用可能与直接促进海马神经干细胞增殖有关。

关键词: 丹酚酸 B; 脑缺血; 神经再生; 鼻腔给药; Morris 水迷宫

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)12-2481-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.018

Effect of salvianolic acid B by intranasal administration on cognitive function and neurogenesis of cerebral ischemia rats

JU Ai-chun^{1,3}, GENG Shi-han², YANG Xin-peng², GUO Da-liang², ZHUANG Peng-wei², ZHOU Da-zheng^{1,3}, LI De-kun^{1,3}, ZHANG Yan-jun²

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** To study the concentration of salvianolic acid B (Sal B) in rat hippocampus after intranasal administration, and to investigate the improvement on cognitive dysfunction of rats with cerebral ischemia treated by intranasal administration of Sal B and its mechanisms. **Methods** HPLC method was employed to check the distribution of Sal B in hippocampus by intranasal administration. Sal B was intranasally administered after one week of cerebral ischemia. The effect of Sal B by intranasal administration on cognitive dysfunction was checked using Morris water maze. The effect of Sal B by intranasal administration on the hippocampus morphological characteristics was studied using Cresyl violet (Nissl) staining. BrdU injection and immunohistochemical staining were used to test the effect of Sal B on the neurogenesis in hippocampus of cerebral ischemic rats. **Results** After intranasal administration of Sal B, the $C_{\max}$ of Sal B was $(2.47 \pm 0.55) \mu\text{g/g}$, and the AUC of Sal B was $(336.4 \pm 73.0) \mu\text{g} \cdot \text{min/g}$. Morris water maze test results

收稿日期: 2017-04-21

作者简介: 鞠爱春, 男, 高级工程师, 黑龙江人, 主要从事中药技术升级研究、质量及生产管理工作。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

*通信作者 庄朋伟, 男, 副教授, 主要从事中药药理研究。Tel: 13212082363 E-mail: zhuangpengwei@163.com

周大铮, 男, 主管药师, 主要从事中药注射剂生产与研发工作。Tel: (022)86342462 E-mail: zhoudz@tasly.com

showed that Sal B by intranasal administration could reduce the average escape latency of cerebral ischemic rats, increase the time in the former platform quadrant and the time of rats across the platform. Compared with the Sham group, the hippocampal CA1 cell layers were reduced and the pyramidal cells showed an irregular arrangement in the model group. Compared with model group, hippocampal morphology was clear, nerve cells arranged in regular, and the number of neurons increased significantly in groups of Sal B by intranasal administration. Immunohistochemistry results showed that the groups of Sal B by intranasal administration could increase the BrdU-positive cell number in hippocampus. **Conclusion** Intranasal administration of SalB can significantly improve the distribution in the hippocampus. Intranasal administration of Sal B could improve the cognitive dysfunction, and this effect maybe related to the directive effect of Sal B on promoting neurogenesis after cerebral ischemic.

Key words: salvianolic acid B; cerebral ischemic; neurogenesis; intranasal administration; Morris water maze

近年来,鼻腔给药用于治疗中枢神经系统疾病的研究日益受到重视,鼻腔给药后,药物可以通过多种途径入脑而发挥疗效。传统中医学认为鼻与脑息息相关。陈士铎在《辨证录》中有“鼻窍通脑”之说,《医林改错》中云:“鼻通于脑,所闻香臭归于脑”,上述记载描述了中医理论中有关鼻与脑的重要关系。近年来,药物经鼻入脑的给药方式成为国内外中枢神经系统疾病给药方式研究的热点,相比传统的口服或 iv 而言,鼻腔给药具有明显的优势:避免首关效应,提高生物利用度;药物吸收快,起效快;使用方便,患者依从性好;有利于脑内药物浓度的提高^[1]。

丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 是从活血化瘀中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 中分离的主要水溶性酚酸类化合物。目前大量基础与临床研究表明丹酚酸 B 对中枢神经系统,尤其是脑缺血损伤具有很好的疗效^[2-5]。前期体外实验研究结果显示,丹酚酸 B 可以促进神经干细胞增殖,且其促增殖效应具有时效和量效关系^[6]。但由于丹酚酸 B 化学结构及稳定性等问题,关于其能否透过血脑屏障 (BBB) 而直接发挥作用尚无明确报道。在前期实验的基础上,本研究考察了丹酚酸 B 鼻腔给药后大鼠海马组织中的药物浓度,进一步考察了鼻腔给药丹酚酸 B 对脑缺血损伤大鼠学习记忆能力的影响,并从神经再生角度初步探讨了其作用机制,以期治疗脑卒中恢复期及后遗症中药新药研发提供依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠,体质量 230~250 g,购于北京维通利华实验动物有限公司,合格证号 SCXK (京) 2011-0001。

1.2 药物与试剂

丹酚酸 B (质量分数 > 98%,批号 MUST-13082008,成都曼斯特生物科技有限公司);

乙腈、甲醇等色谱纯试剂及 BrdU、小鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (Sigma 公司)。

1.3 仪器

岛津 LC-2010A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司);色谱柱为迪马公司 C₁₈ 柱 (250 mm×2.0 mm, 5.0 μm); Morris 水迷宫 (淮北正华生物仪器设备有限公司); CM1850 冷冻切片 (Leica 公司)。

2 方法

2.1 鼻腔给药后大鼠海马组织中丹酚酸 B 的测定

将丹酚酸 B 加入 3% 羧甲基纤维素钠中制得鼻用凝胶制剂。正常大鼠用 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉,切开颈部皮肤,暴露气管和食管,取聚乙烯管通过食道插至鼻腔后部,注射器进行给药 (150 μL/只)。分别于给药后 10、30、60、120、180、240、360 min (每个时间点 6 只大鼠) 0.9% 生理盐水心脏灌流,取脑并剥取海马组织,按 1:2 加入生理盐水制备匀浆液。利用 HPLC 方法^[7]测定海马组织中丹酚酸 B 的峰面积,利用回归方程求得海马组织中丹酚酸 B 的质量浓度。

2.2 实验性脑缺血大鼠模型的复制

采用四动脉结扎法复制实验性脑缺血大鼠模型,将实验大鼠用 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉,暴露第一颈椎横突翼,并找到左右横突孔,用高频电刀永久性阻断椎动脉血流。24 h 后,在大鼠清醒状态下,用动脉夹夹闭两侧颈总动脉,造成四血管关闭,精密计时 6 min 后,开启动脉夹,恢复血液供应。实验过程中,保持肛温 (37.0±0.5) °C,以大鼠出现意识消失、眼球苍白、瞳孔散大、呼吸加深加快,对疼痛刺激无反应、翻正反射和瞳孔对光反射消失为模型成功标志,弃除模型不成功动物。

2.3 Morris 水迷宫实验

实验分为假手术组、模型组、丹酚酸 B 鼻腔给药组。假手术组和模型组鼻腔给予 3% 羧甲基纤维素钠,丹酚酸 B 给药剂量为 50 mg/kg (预试验确定

的合适剂量), 于脑缺血 1 周后开始给药, 每天 1 次, 连续给药 3 周后进行 Morris 水迷宫实验。分别利用定位航行实验的逃避潜伏期和空间探索实验的平台所在象限时间及跨越平台次数评价鼻腔给予丹酚酸 B 对脑缺血大鼠学习记忆能力的影响。

2.4 甲酚紫染色

甲酚紫染色是标记神经元尼氏体的主要手段之一, 正常脑组织经甲酚紫染色后尼氏小体呈紫色, 胶质细胞呈淡紫色, 背景无色。各组大鼠在行为学检测结束后给予 10% 水合氯醛 ip 麻醉后, 用 0.9% 生理盐水经心脏灌注, 后用 4% 多聚甲醛灌注, 经蔗糖逐级脱水后将脑组织行冰冻切片, 采用甲酚紫染色法考察丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠海马区形态学特征的影响。

2.5 BrdU 染色

于 Morris 水迷宫实验结束前 1 d ip BrdU (每次 50 mg/kg) 标记增殖细胞。ip BrdU 标记 4 次, 每次间隔 2 h。实验结束后首先用 0.9% 生理盐水经心脏灌注, 后用 4% 多聚甲醛灌注固定。经蔗糖逐级脱水后将脑组织冰冻切片, 采用免疫组织化学染色法检测脑缺血损伤大鼠海马区 BrdU 阳性细胞数目, 考察丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠神经再生的影响。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件处理数据, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 丹酚酸 B 鼻腔给药后不同时间大鼠海马组织中的药物浓度

本研究建立了测定大鼠海马组织中丹酚酸 B 质量浓度的 HPLC 方法, 选择氯霉素作为内标, 经方法学验证, 线性关系、日内精密度、日间精密度和回收率均符合要求, 可用于测定丹酚酸 B 在海马中的质量浓度, 色谱图见图 1。结果显示, 鼻腔给药能使丹酚酸 B 在海马组织中呈现一定浓度的分布, 并且可在 3 h 左右达到峰值(表 1)。丹酚酸 B 鼻腔给药后海马组织中达峰浓度($C_{\max}$)为 $(2.47 \pm 0.55) \mu\text{g/g}$, 曲线下面积(AUC)为 $(336.4 \pm 73.0) \mu\text{g} \cdot \text{min/g}$ 。

3.2 丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠空间学习记忆能力的影响

在定位航行实验中, 随着训练次数的增加, 各组大鼠平均逃避潜伏期均有所减少。与假手术组比

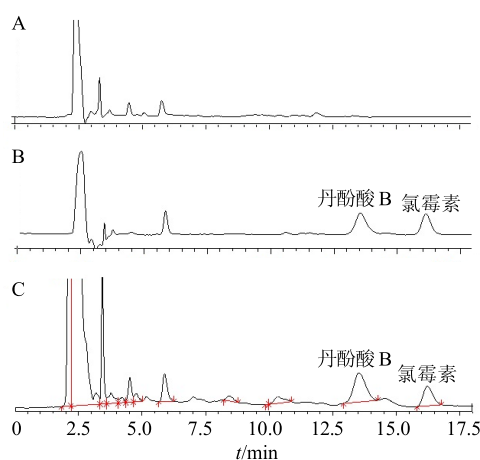


图 1 空白海马组织 (A)、丹酚酸 B 对照品 (B) 和丹酚酸 B 鼻腔给药后海马组织样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of hippocampus blank (A), Sal B standard substance (B), and hippocampus sample after intranasal administration of Sal B (C)

表 1 丹酚酸 B 鼻腔给药后大鼠海马组织中药物质量浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Concentration of Sal B in rats hippocampus after intranasal administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

t/min	丹酚酸 B/(ng·g ⁻¹)
10	673.0 ± 534.9
30	899.0 ± 606.9
60	933.7 ± 811.3
120	1 147.3 ± 585.4
180	1 268.1 ± 1 028.0
240	818.6 ± 683.3
360	308.2 ± 187.5

较, 模型组大鼠训练期间每天的平均逃避潜伏期显著延长, 显示模型组大鼠存在记忆能力下降; 与模型组比较, 丹酚酸 B 鼻腔给药组的平均逃避潜伏期随训练时间的后延而缩短, 显示丹酚酸 B 鼻腔给药在一定程度上改善脑缺血损伤大鼠的学习记忆能力。结果见表 2。

在空间探索实验中, 模型组大鼠在原平台象限停留时间较假手术组明显缩短, 显示脑缺血在一定程度上造成大鼠学习记忆能力下降; 丹酚酸 B 鼻腔给药组在原平台象限停留时间有所延长; 丹酚酸 B 鼻腔给药组表现出更好的定位性和趋向性, 能依靠空间线索找到平台, 游泳轨迹以原平台象限占优势, 其次较多地在原平台象限相邻的左右两侧象限寻找, 很少跨至对侧象限, 而模型组大鼠基本围绕池壁游泳, 较少游向原平台附近, 其运动轨迹呈随

表 2 各组大鼠定位航行实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 2 Results of place navigation tests in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	逃避潜伏期/s			
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
假手术	58.1 ± 8.9	35.0 ± 13.2	21.0 ± 9.1	15.7 ± 7.7
模型	59.4 ± 2.6	47.1 ± 10.4	37.6 ± 11.1 [*]	26.4 ± 10.6 [*]
丹酚酸 B	58.5 ± 10.1	39.8 ± 13.3	28.4 ± 9.9 [#]	20.5 ± 10.4

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{*} $P < 0.05$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

机分布于各象限之中。模型组跨越原平台次数较假手术组显著减少 ($P < 0.01$), 丹酚酸 B 鼻腔给药组跨越原平台次数较模型组增多 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.3 丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠海马区形态学特征的影响

甲酚紫染色结果显示, 假手术组大鼠海马形态完整, 结构清晰, 神经细胞排列规则, CA1 区神经细胞为 4~5 层, 且排列整齐, 尼氏体呈均匀的蓝紫色着色, 数量较多且胞体较大。模型组大鼠海马 CA1 区细胞层数减少, 锥体细胞数目明显减少, 神经元细胞间隙变大, 且排列不规则, 细胞皱缩, 甚至出现脱失和中断, 部分细胞可见胞体肿大及核裂解和碎裂现象。与模型组比较, 丹酚酸 B 鼻腔给药组海马形态结构清晰, 神经细胞排列较规则, 神经元数目明显增多。见图 2。

3.4 丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠海马区神经干细胞增殖的影响

免疫组织化学染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组的 BrdU 阳性细胞数目无明显变化; 与模型组比较, 丹酚酸 B 可以显著增加脑缺血损伤大鼠海马区域细胞增殖标志物 BrdU 阳性细胞数目。结果提示丹酚酸 B 鼻腔给药能促进脑缺血损伤大鼠海马区神经干细胞的增殖。见图 3 和表 4。

表 3 各组大鼠空间探索实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 3 Results of spatial probe tests in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	平台象限停留时间/s	跨越原平台次数/次
假手术	31.7 ± 7.2	4.0 ± 1.6
模型	22.7 ± 6.8	2.2 ± 0.6 ^{**}
丹酚酸 B	28.6 ± 5.7	3.1 ± 1.0 [#]

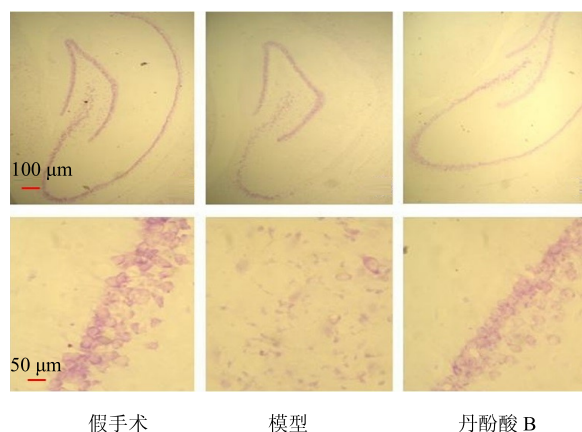
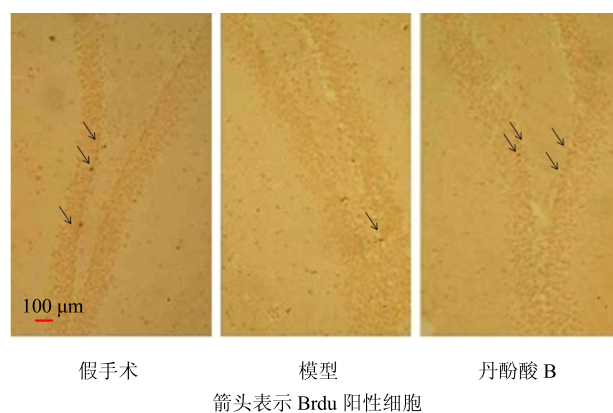
与假手术比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

图 2 各组大鼠海马组织甲酚紫染色结果

Fig. 2 Cresyl violet staining results of hippocampus in rats of each group



The arrow indicates the positive cells of BrdU

图 3 各组大鼠脑组织 BrdU 染色结果

Fig. 3 BrdU staining results of brain tissue of rats in each group

4 讨论

由于血脑屏障 (BBB) 的存在, 极大地制约了药物直接进入中枢神经系统疾病发挥作用。鼻腔给药是治疗中枢神经系统疾病的一种有效给药方式^[8], 越来越受到人们的关注, 许润春等^[9]对脑缺血

表 4 丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠海马区 BrdU 阳性细胞数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of Sal B by intranasal administration on Brdu positive number after brain ischemic injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	BrdU 阳性细胞数目/个
假手术	8.7±1.4
模型	7.2±2.1
丹酚酸 B	15.3±2.5 ^{**##}

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

损伤大鼠使用黄芩苷磷脂复合物经鼻给药和舌下 iv 给药后,发现经鼻给药防治脑缺血损伤导致的脑水肿和神经功能损伤的效果优于舌下 iv 给药。吴云娟等^[10]研究发现,三七总皂苷鼻腔给药后可明显缓解沙鼠脑缺血再灌注所引起的脑水肿和脑卒中症状,而口服给药几乎没有治疗作用。本研究利用鼻腔给药的方式拟避开 BBB 考察了丹酚酸 B 对缺血性脑卒中的治疗作用,首先进行了脑内丹酚酸 B 定量分析,结果发现鼻腔给药能使丹酚酸 B 在海马组织中呈现一定浓度的分布,并且可在 3 h 左右达到高峰。丹酚酸 B 鼻腔给药后海马组织中 $C_{\max}$ 为 $(2.47 \pm 0.55) \mu\text{g/g}$ 和 AUC 为 $(336.4 \pm 73.0) \mu\text{g} \cdot \text{min/g}$,结果提示丹酚酸 B 经鼻腔给药可以直接进入脑组织发挥作用。

在明确丹酚酸 B 鼻腔给药的脑内分布基础上,首先利用 Morris 水迷宫实验考察了鼻腔给予丹酚酸 B 对实验大鼠学习记忆能力的影响,结果表明,丹酚酸 B 鼻腔给药可显著改善脑缺血大鼠的学习记忆能力,与其前报道一致^[3,11],丹酚酸 B 可能通过神经保护、调节神经再生等环节发挥脑保护、改善模型大鼠学习记忆能力的作用。在改善认知供能药效明确的基础上,进一步从调控神经再生角度初步探讨了其作用机制。丹酚酸 B 鼻腔给药可以增加脑缺血损伤大鼠海马区新生神经细胞数目,促进海马区神经细胞增殖,且对新生神经细胞有保护作用,能明显改善脑缺血损伤大鼠的学习记忆能力。

鼻腔给药可通过嗅黏膜绕过 BBB 将药物直接转运至脑中,是一种简便、无损伤性的给药途径^[12],

可以减轻或消除药物及其附加剂的纤毛毒性以及促进药物在鼻黏膜的吸收,增加脑内药物浓度^[13],从而提高疗效。关于鼻腔给药的剂型也越来越引起医药界的关注,其中枢神经系统疾病治疗中的应用前景令人瞩目。

参考文献

- [1] Jogani V, Jinturkar K, Vyas T, *et al.* Recent patents review on in-tranasal administration for CNS drug delivery [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2008, 2(1): 25-40.
- [2] 钟 静,唐民科,张 妍,等.丹酚酸 B 对脑缺血再灌注大鼠神经细胞损伤和神经发生的影响 [J]. *药学报*, 2007, 42(7): 716-721.
- [3] 肖文喜,汪 红,钟晓明,等.丹酚酸 B 对小鼠急性局灶性脑缺血的神经保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(17): 163-166.
- [4] 唐民科,范 悦,刘长锁,等.丹酚酸 B 神经保护作用的机制与研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2014, 4(1): 1-10.
- [5] 林 惠,杨万章.丹酚酸 B 治疗脑卒中的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(4): 479-481.
- [6] Zhuang P, Zhang Y, Cui G, *et al.* Direct stimulation of adult neural stem/progenitor cells *in vitro* and neurogenesis *in vivo* by salvianolic acid B [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35636.
- [7] 杜 秋,杜守颖,李鹏跃,等.丹酚酸 B 大鼠在体鼻循环吸收研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(2): 303-308.
- [8] Pires A, Fortuna A, Alves G, *et al.* Intranasal drug delivery: How, why and what for [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2009, 12(3): 288-311.
- [9] 许润春,林彦君,周晓玲,等.黄芩苷及其磷脂复合物药效学对比研究-在体鼻黏膜吸收及不同给药途径抗大鼠脑水肿和神经功能损伤对比 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17): 132-136.
- [10] 吴云娟,朱晓艺,沙先宜.三七总皂苷鼻腔给药的药代动力学与药效学 [J]. *药学报*, 2005, 40(4): 377-381.
- [11] 郭国庆,李 斌,王圆圆,等.丹酚酸 B 促进胎鼠大脑皮质神经干细胞增殖、突起生长和分化 [J]. *中国科学·C 辑: 生命科学*, 2009, 39(8): 793-802.
- [12] 徐 攀,杜守颖,黎 迎,等.经鼻脑靶向给药系统研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(2): 247-251.
- [13] 周 荣,金 铭,沈淼山,等.聚山梨醇-80 修饰的神经毒素纳米粒经大鼠鼻腔给药后体内分布研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2599-2602.