

银杏总内酯在脑缺血损伤模型大鼠体内的 PK-PD 研究

陈 璟^{1,2}, 吕志阳¹, 汪 洁¹, 甘啸阳², 许惠琴^{2*}, 王 威², 吴丽莉¹, 狄留庆², 许会芹²

1. 南京中医药大学翰林学院, 江苏 泰州 225300

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 基于药效学-药动学 (PK-PD) 结合模型探索银杏总内酯在脑缺血损伤模型大鼠体内的代谢过程。方法 通过线栓法建立大鼠大脑中动脉局灶性栓塞 (MCAO) 模型, 再灌注后分别以鼻腔、ig 和尾 iv 给予银杏总内酯溶液, 于给药后 0.25、0.33、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0 h 眼眶取血, 利用 LC-MS 测定血浆中银杏内酯 B 的质量浓度, 绘制药-时曲线; 通过试剂盒测定血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的量, 绘制时-效曲线; 采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数并拟合 PK-PD 结合模型。结果 给药组大鼠体内中银杏内酯 B 的消除半衰期 ($t_{1/2}$) 均较小, 鼻腔给药组大鼠的药时曲线下面积 (AUC) 明显高于 ig 组和尾 iv 组。结论 银杏内酯 B 对缺血性脑卒中疾病有良好的保护和缓解作用, 鼻腔给药方式较 iv 和 ig 方式更具有药动学优势, 可以为研发银杏内酯 B 的鼻腔给药制剂提供参考。

关键词: 银杏总内酯; 脑缺血损伤模型; PK-PD; 银杏内酯 B; 鼻腔给药

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0885-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.022

Study on pharmacokinetics and pharmacodynamics of ginkgolides in rat model with cerebral ischemia injury

CHEN Jing^{1,2}, LV Zhi-yang¹, WANG Jie¹, GAN Xiao-yang², XU Hui-qin², WANG Wei², WU Li-li¹, DI Liu-qing², XU Hui-qin²

1. College of Hanlin, Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, China

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the metabolic process of ginkgolides in rats with cerebral ischemic injury based on pharmacokinetic-pharmacodynamics (PK-PD) binding model. **Methods** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by the suture method. After reperfusion, rats were randomly assigned to nasal administration, ig administration, and iv administration group. The orbital blood was taken at different time points of 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 9.0, and 12.0 h after the administration of the ginkgolides solution. The drug-time curve of ginkgolide B in plasma were drawn according to the concentration measured by LC-MS. The time-effect curve of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were drawn based on the value measured by the kit. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 software to fit the PK-PD binding model. **Results** The $t_{1/2}$ of ginkgolide B of the rats in the administration group was smaller than that in the MCAO model group. The area under the curve (AUC) of nasal administration was significantly higher than intragastric administration and intravenous administration. **Conclusion** Ginkgolide B has a good protective and mitigating effect on ischemic stroke. The pharmacokinetics of nasal administration is better than iv and ig administration, which can provide reference for the development of nasal administration of ginkgolide B.

Key words: ginkgolides; cerebral ischemic injury model; PK-PD; ginkgolide B; nasal administration

脑血管疾病常常被称为脑卒中, 该疾病具有高发病率、高死亡率、高致残率和高复发率等特点。

截止 2016 年, 我国脑卒中的发病率以每年 8.7% 的速度上升, 是威胁人类健康的重大疾病之一, 越来

收稿日期: 2017-08-12

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20161371); 江苏省高校自然科学基金项目 (15KJB360011)

作者简介: 陈 璟, 男, 中药学博士在读, 讲师, 研究方向为药物新型给药系统。Tel: 18652979855 E-mail: pharm_chenjing@163.com

*通信作者 许惠琴, 女, 博士, 教授, 博士生导师。

越引发关注^[1]。急性脑缺血-再灌注造成的损伤可以严重损害人的神经细胞,造成神经系统功能损伤^[2],银杏内酯(ginkgolides)是临床治疗急性脑缺血疾病的常用药物之一。银杏内酯主要活性成分有银杏内酯A、B、C等,是天然的血小板活化因子(PAF)拮抗剂,而其中银杏内酯B的活性最强^[3-4]。研究表明^[5],银杏内酯通常与PAF受体结合,竞争性抑制PAF,从而有效抑制组织部位缺血所引发的各种炎症反应或者栓塞的形成。目前市场上有关银杏内酯的剂型较多,注射剂和口服制剂应用更广泛^[6]。相比之下,鼻腔给药应用不多。鼻腔中鼻黏膜在生理上与大脑部位存在着比较特殊的联系,药物通常能够比较容易的透过血脑屏障(BBB)快速到达脑部,发挥药效,具有吸收快、生物利用度高、机体损伤小等优点^[7]。本实验通过测定银杏总内酯鼻腔给药后大鼠体内银杏内酯B的血药浓度和超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)量的变化,拟合PK-PD模型,研究银杏总内酯鼻腔给药在体内的药动学行为,为临床开发新剂型提供可供参考的依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD雄性大鼠40只,体质量250~280 g,由南京中医药大学实验室提供,动物许可证号SYKX(浙)2014-001。22~24℃,日、夜光照各12 h,给予充足的水和饲料,适应性喂养1周,实验前12 h禁食不禁水。

1.2 器材

栓线(适用于250~280 g大鼠,北京西浓科技有限公司);医用真丝编织线5M灭菌线团[(6-0)、(4-0),上海浦东金环医疗用品股份有限公司];手术剪、弯镊、直镊、止血钳、缝合针(上海医疗器械有限公司手术器械厂);小号止血夹(宁波医用缝合有限公司);5427R小型冷冻高速离心机(德国艾本德公司);VORTEX-5漩涡混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司);UV1800PC型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);低温冰箱(-20、-4℃);FA1204B万分之一电子天平(上海精密科学有限公司);Agilent1260型高效液相色谱仪、Agilent型三重四级杆质谱仪(Agilent公司)。

1.3 药品与试剂

银杏总内酯原料药(银杏内酯B质量分数为30%,南京市紫曦生物制品有限公司,批号20140123);对照品银杏内酯B(批号110863-

201611,质量分数95.6%),格列本脲(批号100135-201105,质量分数99.5%),中国食品药品检定研究院;SOD试剂盒(批号20170428)、MDA试剂盒(批号20170502)购于南京建成生物工程研究所;甲醇、甲酸水均为质谱纯;自制双蒸水。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将大鼠随机分为5组,分别为对照组、模型组、鼻腔给药组、尾iv给药组、ig给药组,每组各5只。采用改良的线栓法^[8]制备大鼠急性脑缺血模型:通过ip水合氯醛麻醉大鼠,从颈正中切开约2 cm切口,分离颈外动脉和颈内动脉,由颈总动脉插入适宜的栓线至颈内动脉,阻断大脑中动脉初端及其他侧支血管的血流,导致大鼠发生急性脑缺血。

给药组大鼠于造模前1周开始,分别以鼻腔、尾iv和ig方式给药,每日1次,剂量为14 mg/kg(折算银杏内酯B约4 mg/kg,临床上成人每人每天的用量为20~40 mg^[9],假设成人体质量60 kg,按40 mg/人的标准计算,成人每日用药量为0.67 mg/kg,按体表面积折算,给予大鼠银杏内酯B的药量等效剂量为4 mg/kg)。第7天于造模后缺血1.5 h,再灌注1.0 h后分别给药1次。模型组、对照组大鼠同上述时间点用生理盐水同等剂量鼻腔给药。

2.2 血样采集

各给药组大鼠分别于末次给药后0.25、0.33、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0 h眼眶取血0.5 mL,置于1.5 mL含肝素钠的EP管中保存,处理后用于质谱检测,另取0.5 mL血样,4 000 r/min离心10 min,取上清血浆,存放于-20℃冰箱^[10],用于SOD、MDA检测。模型组与对照组大鼠同上述操作眼眶取血,离心后取上清液-20℃保存。

2.3 血浆中银杏内酯B质量浓度的测定

2.3.1 溶液的制备

(1)银杏内酯B对照品溶液的制备:精密称取银杏内酯B对照品20 mg置于100 mL量瓶中,用甲醇溶解配成质量浓度为200 µg/mL的银杏内酯B储备液;从中取出1 mL于10 mL量瓶中加甲醇稀释至刻度线,制得质量浓度为20.0 µg/mL储备液,依此操作分别制备质量浓度为0.1、1.0、2.0、5.0、10.0 µg/mL的储备液,于4℃冰箱中保存。

(2)内标溶液的制备:精密称取格列本脲对照品20 mg置于100 mL量瓶中,用甲醇溶解配成质

量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的格列本脲储备液；从中取出 1 mL，加入 100 mL 量瓶，添加甲醇至刻度线，即稀释成质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 储备液；继续从中取出 1 mL 于 10 mL 量瓶中稀释至刻度线，制得质量浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 内标液，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.3.2 色谱条件与质谱条件

(1) 色谱条件：采用 Zorbax Eclipse XDB 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇-0.4% 甲酸水溶液 (70:30)，体积流量 0.300 mL/min，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量为 10 μL 。

(2) 质谱条件：电喷雾离子源 (ESI)，选择离子检测方式：多反应监测模式 (MRM)，采用负离子方式检测，干燥气温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥气体积流量 5.0 L/min，雾化器压力 137.9 kPa，毛细管电压 3 500 V，银杏内酯 B 检测离子对 m/z 423.0~367.0。

2.3.3 样品检测 取“2.2”项下抗凝血浆样品 60 μL ，加入 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 格列本脲内标液 10 μL 及甲醇 60 μL 混合均匀，电动涡旋器混匀 1 min，12 700 r/min 离心 10 min，静置使蛋白充分沉淀，提取上清液混合均匀后 10 μL 进样，进行 LC-MS 测定^[11]。

2.3.4 专属性考察 取对照组大鼠的空白血浆、空白血浆加对照品及内标液、给药组大鼠血浆样品各 50 μL ^[12]，按“2.3.3”项下方法处理，进样 10 μL 。结果表明进样后形成的银杏内酯 B、格列本脲（内标物）的峰形良好且峰之间能实现良好分离，干扰峰少。银杏内酯 B 在 1.0 min 出峰，内标物格列本脲的出峰时间在 2.0 min。结果如图 1 所示。

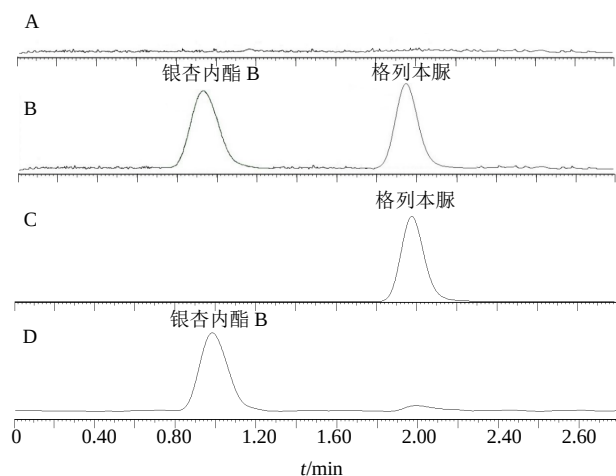


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+银杏内酯 B+内标 (B)、含药血浆样品+内标 (C、D) 色谱图

Fig. 1 LC-MS of blank plasma (A), blank plasma + ginkgolide B + internal standard (B), and plasma with drug sample + internal standard (C, D)

2.3.5 线性关系考察 取 5 份对照组大鼠空白血浆，每份 50 μL ，按“2.3.3”项下方法进行血样处理，分别加入“2.3.1”项下甲醇溶解的银杏内酯 B 对照品系列溶液 10 μL ，制得质量浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照品血浆，混合均匀后进样 10 μL ，以银杏内酯 B 峰面积为纵坐标 (Y)，银杏内酯 B 的质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归，得到回归方程 $Y=2.010 X-0.020 4$ ， $r=0.999 8$ ^[13]，表明银杏内酯 B 在质量浓度为 0.05~10 $\mu\text{g/mL}$ 呈现良好的线性关系，最低定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.6 精密度、准确度和回收率 取对照组大鼠空白血浆 50 μL ，按“2.3.3”项下方法操作进行血样处理，分别精密加入银杏内酯 B 对照品溶液，使得质量浓度分别为 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，每个质量浓度测 3 份，分别于 1 d 内不同时间测定，计算得平均日内精密度 RSD 为 2.0%~3.5%，平均相对回收率为 96.35%~99.57%^[12]，RSD 为 2.9%~4.3%，准确度为 92.36%~103.60%。

2.4 血清中 SOD 活性和 MDA 水平测定

2.4.1 SOD 活性的测定 参考试剂盒内说明书指示操作，漩涡混匀器混匀，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 40 min，室温放置 10 min，于波长 532 nm 处，1 cm 光径比色杯，双蒸水调零，比色法测定吸光度 (A) 值，根据公式：总 SOD 活力=(A_{对照}-A_{给药})/A_{对照} $\times$ 2 $\times$ 体系稀释倍数 $\times$ 样品测试前稀释倍数，计算出 SOD 活性。

2.4.2 MDA 水平的测定 参考试剂盒说明书指示操作，漩涡混匀器混匀，试管口用保鲜膜扎紧，用针头刺以小孔，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min，取出后流水冷却，3 500~4 000 r/min 离心 10 min。取上清液，532 nm 处，1 cm 光径，双蒸水调零，测各管 A 值，根据公式：MDA 量=(A_{给药}-A_{对照})/(A_{标准}-A_{空白}) $\times$ 对照品质量浓度/待测样品蛋白质量浓度，计算出 MDA 的量。

3 结果

3.1 银杏内酯 B 药动力学结果

按照“2.3.2”项下色谱及质谱条件，通过 LC-MS 测定 ig 组、尾 iv 组、鼻腔给药组大鼠不同时间点血浆中银杏内酯 B 的质量浓度，绘制药-时曲线，如图 2 所示。主要药动力学参数见表 1。

由图 2 及表 1 可知，除尾 iv 给药不存在吸收过程外，ig 与鼻腔给药的方式银杏内酯 B 在体内吸收迅速，均在 1 h 左右达峰，鼻腔给药较 ig 给药吸收更快，达峰浓度 (C_{max}) 为 3 组中最高，分析可能

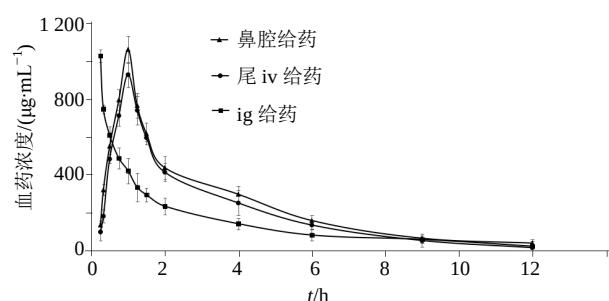


图 2 各组大鼠血浆中银杏内酯 B 药-时曲线

Fig. 2 Concentration-time curve of ginkgolide B in plasma of rats in each group

表 1 银杏内酯 B 在脑缺血大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 1 *In vivo* main PK parameters of ginkgolide B in cerebral ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	鼻腔给药	尾 iv 给药	ig 给药
$AUC_{0 \sim t}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	$2\ 864.78 \pm 550.91$	$2\ 158.94 \pm 415.28$	$2\ 504.27 \pm 481.99$
$AUC_{0 \sim \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	$3\ 018.44 \pm 461.54$	$2\ 257.03 \pm 345.64$	$2\ 549.10 \pm 387.98$
$AUMC_{0 \sim \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h}^2 \cdot \text{L}^{-1}$	$11\ 854.63 \pm 2\ 171.17$	$7\ 161.86 \pm 1\ 263.11$	$8\ 849.51 \pm 1\ 544.41$
$MRT_{0 \sim \infty}$	h	3.93 ± 0.50	3.17 ± 0.41	3.31 ± 0.42
$t_{1/2}$	h	2.73 ± 0.48	2.96 ± 0.52	2.07 ± 0.36
$t_{\max}$	h	1.00 ± 0.16	0.25 ± 0.04	1.21 ± 0.21
CL	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	1.39 ± 0.25	1.86 ± 0.33	1.65 ± 0.27
V	L	5.48 ± 0.99	7.94 ± 1.41	4.92 ± 0.81
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$1\ 065.75 \pm 208.82$	$1\ 032.39 \pm 184.28$	932.67 ± 147.94

3 种方式给药后的大鼠血浆中 MDA 的量均不同程度降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，其中尾 iv 给药与鼻腔给药组较 ig 给药组降低更快，且鼻腔给药组的 $MDA_{\min}$ 为 3 组中最低，表明鼻腔给药方式降低血浆中 MDA 值更明显，能够发挥更好的疗效。

由表 2 可知，与对照组比较，模型组大鼠血浆中 SOD 活性显著下降 ($P < 0.001$)。与模型组比较，给药后各组大鼠血浆中 SOD 活性随着血浆中银杏内酯 B 质量浓度的升高均有不同程度升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，其中鼻腔给药组 $SOD_{\max}$ 最高，表明鼻腔给药方式对 SOD 活性升高作用更明显，能够发挥更好的疗效。

4 银杏总内酯在大鼠体内的 PK-PD 拟合模型

4.1 银杏总内酯鼻腔给药后血药浓度-时间-SOD 效应拟合

实验中得到鼻腔给药组大鼠血浆中 SOD 活性数据，根据银杏内酯 B 血药浓度、SOD 活性数据绘制了血药浓度-时间-SOD 效应图 (图 3)。给药后

原因为鼻腔给药后脂溶性的银杏内酯 B 经鼻黏膜迅速吸收，避免了口服的首关效应。鼻腔给药组大鼠血浆中银杏内酯 B 的平均滞留时间 (MRT) 最长，表明鼻腔给药的方式能够延长药物在大鼠体内的作用时间。3 个给药组中，鼻腔给药组药时曲线下面积 (AUC) 最高，表明银杏内酯 B 通过鼻腔给药吸收更好。

3.2 银杏总内酯对大鼠血浆中 SOD 活性、MDA 量的影响

由表 2 可知，与对照组比较，模型组大鼠血浆中 MDA 量显著提高 ($P < 0.001$)。与模型组比较，

SOD 活性的变化和血药浓度变化基本呈正比，给药 4~12 h，银杏内酯 B 的血药浓度下降而 SOD 活性基本保持稳定。推测可能是由于银杏总内酯中其他成分如银杏内酯 A、银杏内酯 C 等也发挥了一定的作用。

4.2 银杏总内酯鼻腔给药后血药浓度-时间-MDA 含量拟合

实验中得到鼻腔给药组的大鼠血浆中 MDA 水平的数据，根据银杏内酯 B、MDA 量的数据绘制了血药浓度-时间-MDA 含量图，见图 4。由图 4 可知，给药后 MDA 量和银杏内酯 B 的血药浓度变化基本呈反比，给药 1 h 左右，银杏内酯 B 的血药浓度达到峰值，MDA 含量达到谷值。

5 讨论

5.1 大鼠急性脑缺血模型造模方法的选择

研究表明^[14]，脑卒中多发生于人体大脑的中动脉部位，所以大部分局灶性脑缺血动物模型以大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型为基础。建立急性脑缺

表 2 不同时间点各组大鼠血浆中 MDA 的量和 SOD 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 MDA amount and SOD activity in plasma at different time points of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	t/h	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
对照	—	15.37 ± 35.25	638.35 ± 29.56
模型	—	80.05 ± 19.54***	342.34 ± 26.98***
鼻腔给药	0.25	73.68 ± 3.26	350.38 ± 15.31
	0.33	58.95 ± 3.91 [#]	420.93 ± 12.353 [#]
	0.50	47.37 ± 4.32 [#]	495.28 ± 18.34 ^{##}
	0.75	41.05 ± 3.98 ^{##}	572.28 ± 19.52 ^{##}
	1.00	29.47 ± 1.56 ^{###}	606.54 ± 22.61 ^{###}
	1.25	36.84 ± 2.87 ^{###}	445.47 ± 19.38 ^{##}
	1.50	41.05 ± 3.01 ^{##}	427.95 ± 23.56 [#]
	2.00	45.26 ± 3.25 [#]	420.33 ± 30.15 [#]
	4.00	50.53 ± 3.58 [#]	435.52 ± 26.33 [#]
	6.00	54.74 ± 4.05 [#]	422.61 ± 24.31 [#]
	9.00	57.90 ± 4.32 [#]	420.85 ± 27.52 [#]
	12.00	61.05 ± 5.01	439.14 ± 20.63 [#]
ig 给药	0.25	83.16 ± 5.03	342.55 ± 15.32
	0.33	69.47 ± 4.51	389.21 ± 18.35
	0.50	60.00 ± 3.96 [#]	448.35 ± 19.21 [#]
	0.75	48.42 ± 3.78 ^{##}	500.68 ± 21.53 ^{##}
	1.00	41.05 ± 2.81 ^{###}	531.73 ± 19.56 ^{###}
	1.25	35.74 ± 2.53 ^{###}	573.26 ± 21.33 ^{###}
	1.50	43.16 ± 3.16 ^{###}	496.25 ± 18.45 ^{##}
	2.00	49.49 ± 3.55 ^{##}	423.81 ± 17.86 [#]
	4.00	56.84 ± 4.06 [#]	380.62 ± 25.78 [#]
	6.00	63.16 ± 4.68	382.21 ± 28.31 [#]
	9.00	69.47 ± 5.12	375.44 ± 27.54
	12.00	74.74 ± 4.59	359.23 ± 26.86
尾 iv 给药	0.25	68.42 ± 5.03	355.14 ± 20.12
	0.33	55.79 ± 4.56 ^{##}	429.22 ± 18.34 [#]
	0.50	44.21 ± 4.23 ^{###}	496.39 ± 23.57 ^{##}
	0.75	32.63 ± 3.85 ^{###}	598.61 ± 35.12 ^{###}
	1.00	40.00 ± 3.76 ^{###}	546.34 ± 25.49 ^{###}
	1.25	45.26 ± 2.86 ^{##}	480.55 ± 30.34 ^{##}
	1.50	50.55 ± 3.41 [#]	450.43 ± 19.28 ^{##}
	2.00	55.79 ± 4.05 [#]	418.15 ± 26.35 [#]
	4.00	61.05 ± 5.21	401.35 ± 24.12 [#]
	6.00	65.26 ± 4.68	390.53 ± 27.31
	9.00	68.42 ± 3.81	395.25 ± 23.15
	12.00	70.53 ± 3.72	383.22 ± 25.52

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group

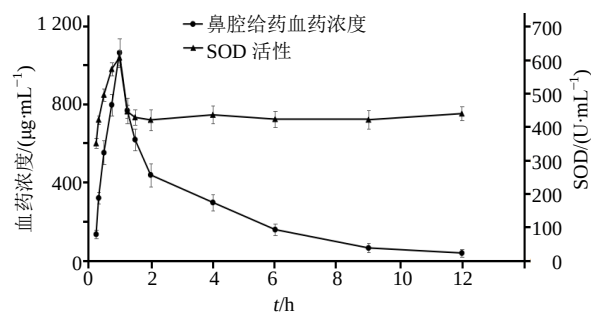


图 3 鼻腔给药银杏内酯 B 血药浓度-时间-SOD 效应图 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect diagram of blood drug concentration-time-SOD of ginkgolide B with nasal administration ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

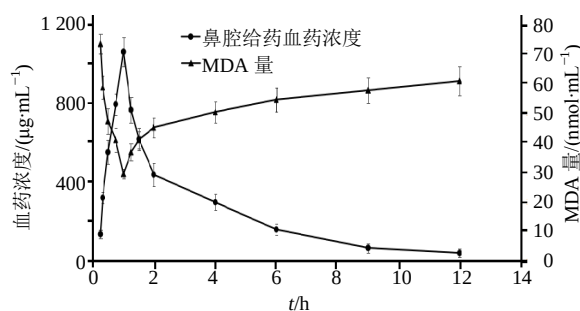


图 4 鼻腔给药银杏内酯 B 血药浓度-时间-MDA 效应图 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Diagram of blood drug concentration-time-MDA of ginkgolide B with nasal administration ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

血模型的方法主要有线栓法、电凝法、三氯化铁法、光化学法等^[15]。三氯化铁法造模后动物大脑神经的损伤较线栓法严重,并且脑水肿和梗死体积也相对较大^[16];电流损伤法造模影响因素比较多,如实验动物的年龄与环境等,在制作老龄大鼠脑阻塞模型时较为适宜^[17]。本实验选用的是改良线栓法^[15],其特点是操作简单,新手容易掌握,线栓时无需结扎翼腭动脉,成功率较高。

此外,选用造模的大鼠体质量应该控制在 250~300 g,当体质量<240 g 时,大鼠的中动脉相对较窄,而栓线显粗,不易插入;>300 g 后,血管增粗而栓线较细不容易阻断血流造模。

5.2 银杏总内酯缓解、治疗急性脑缺血的机制

脑缺血疾病多伴随着葡萄糖、ATP 和糖原等能量代谢的损耗,产生花生四烯酸,容易发生兴奋性氨基酸毒性中毒等。银杏内酯作为特异性 PAF 受体的拮抗剂,竞争性地与 PAF 受体结合,可以降低 MDA、乳酸(LA)等的量,减慢脑组织脂质的过氧化反应速率,同时银杏内酯还可以升高 SOD、

谷胱甘肽(GSH)等的量,提高自由基清除酶活性,加快清除超氧阴离子。急性脑缺血疾病如缺血性脑卒中的基本治疗原则^[18]是在最短时间内恢复大脑缺血区的血流供应,改善脑部的微循环从而减轻脑部神经功能的损伤。

5.3 银杏总内酯鼻腔给药方式对于新剂型开发的启示

随着经济的发展和生活水平的提高,中枢神经系统疾病,尤其是脑部常见的疾病如急性缺血性脑卒中等越来越受到社会的关注。研究表明^[19],血脑屏障的损伤与脑缺血再灌注损伤的发生和发展有着密切的联系,所以,如何使得大分子药物较容易地透过血脑屏障以及减少血脑屏障的损伤对于新药以及新剂型的研究意义重大。

鼻腔给药系统(NDDS)是指在鼻腔内使用,通过鼻黏膜吸收而发挥全身或者局部作用的一类制剂。相比于口服胃肠道吸收的药物而言,鼻腔给药无需经过肝脏的首关效应即可直接到达病变部位,很大程度上提高了生物利用度,给药剂量上鼻腔给药也比口服给药的剂量少,减少药物带来的毒副作用。鼻腔给药最大的特点就是通过鼻黏膜吸收迅速到达给药部位发挥药理作用,这对中枢神经系统疾病如急性脑卒中的抢救和治疗极为重要,只有在最短时间内到达脑部病变部位才能减轻神经损伤^[20],鼻腔给药可有多种剂型,如喷雾剂、粉雾剂、滴鼻剂等。

本实验结合银杏总内酯脂溶性特点以及鼻腔给药方式开展研究,实验结果表明银杏总内酯鼻腔给药后在大鼠体内吸收迅速,达峰浓度高且MRT长,相比ig及iv给药途径更能高效缓解急性脑缺血。本实验结果为进一步研究开发银杏内酯鼻腔给药新剂型提供一定的理论基础,为临床治疗脑卒中提供参考。

参考文献

- [1] 江海均. 黄连解毒汤中栀子苷在脑缺血大鼠体内的PK-PD研究[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(1): 23-28.
- [2] 秦兵. 银杏内酯B对脑缺血-再灌注神经元损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 12(1): 17-20.
- [3] 张学非, 曹泽戎, 许治良, 等. 银杏内酯治疗脑缺血作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2943-2948.
- [4] 李思佳, 耿剑亮, 张悦, 等. 银杏药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 731-741.
- [5] 王涛, 王建新, 韩丽妹. 银杏内酯B及银杏内酯提取物大鼠体内药动学比较[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(12): 1411-1412.
- [6] 蔡晓蕾, 陈卫东. 银杏内酯B剂型研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32(1): 86-90.
- [7] 王鹏, 肖学风. 经鼻脑靶向递药系统的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 96-97.
- [8] 赵凯, 张国华, 贾宇臣, 等. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改良及探讨[J]. 中国卒中杂志, 2012, 7(12): 917-918.
- [9] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [10] 张硕峰, 贾占红, 吴金英, 等. 银杏内酯B注射液对局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中日友好医院学报, 2006, 20(4): 229-231.
- [11] 王亚峰. LC-MS/MS法测定大鼠血浆美托洛尔和代谢物浓度的方法学建立及其在药动学与药物相互作用中的应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2014.
- [12] 葛莹莹, 任伟超, 陈西敬, 等. LC-MS法测定大鼠血浆中银杏内酯B的浓度[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 48-52.
- [13] 缪培, 张通, 米海霞. 基于线栓法大鼠大脑中动脉闭塞的局灶性脑缺血模型的比较研究[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(10): 1190-1195.
- [14] 包玉龙, 杜佳林, 张宏, 等. 大鼠脑缺血动物模型研究进展[J]. 实验动物科学, 2009, 26(6): 50-52.
- [15] 翟小虎, 王斌, 宋亚刚, 等. 线栓法制备大鼠脑缺血模型的研究进展与思路[J]. 实验动物科学, 2015, 32(5): 55-58.
- [16] 包玉龙, 朱竟赫. 线栓法与改良的三氯化铁法致大鼠大脑中动脉闭塞模型的对比研究[J]. 动物医学进展, 2014, 35(5): 68-71.
- [17] Wang L C, Futrell N, Wang D Z, et al. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long term survival, in aged rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2087-2090.
- [18] Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein R A. Acute stroke intervention: A systematic review[J]. JAMA, 2015, 313(14): 1451-1462.
- [19] 邹伟, 孙晓伟, 于学平, 等. 血脑屏障与脑缺血再灌注损伤研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2009, 29(3): 467-468.
- [20] 吕莹, 张栋, 张超, 等. 鼻腔给药研究进展[J]. 天津中医药, 2014, 31(12): 766-767.