

3,5-二咖啡酰奎宁酸体外透血脑屏障能力及抗大鼠脑缺血再灌注损伤作用研究*

盛艳梅, 唐绍微, 张静¹, 张艺^{1**}(成都医学院药学院, 成都 610500; ¹成都中医药大学民族医药学院, 成都 610075)

摘要 目的: 研究灯盏细辛活性成分 3,5-二咖啡酰奎宁酸的体外透血脑屏障(BBB)能力及其对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响。方法: 采用体外血脑屏障模型结合 HPLC 技术评价 3,5-二咖啡酰奎宁酸的透血脑屏障能力。预给药 3 天后, 采用线栓法阻塞大鼠中动脉(MCA)致大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 继续给药 2 天后, 对各组大鼠进行神经功能缺失评分, 并测定大鼠的脑梗死比率及其血清中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮合酶(NOS)含量。结果: 3,5-二咖啡酰奎宁酸 0.2 mg/ml 对血脑屏障的透过率可达 79%; 与模型对照组比较, 该药 18.25 mg/kg、9.13 mg/kg 均能不同程度提高 SOD、GSH-Px、NOS 的活性, 降低 MDA 活性及大鼠脑梗死比率与其神经行为学评分水平。结论: 3,5-二咖啡酰奎宁酸能很好的透过血脑屏障, 可通过降低大鼠脑梗死比率, 增加脑缺血再灌注损伤大鼠血清 SOD、GSH-Px、NOS 活性, 降低 MDA 含量, 并改善其神经行为学体征, 产生脑缺血保护作用。

关键词 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 血脑屏障; 脑缺血再灌注

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2016.06.008

缺血性脑血管病(Ischemic Cerebral Vascular Disease, ICVD)目前仍缺乏有效的治疗方法与药物。灯盏细辛作为活血化瘀中药, 由于具有良好治疗作用, 现已开发出灯盏细辛注射液、灯盏花素注射液、灯盏花素片等制剂, 其主要活性成分为黄酮类化合物以及咖啡酰类化合物^[1-3]。课题组前期研究发现灯盏细辛咖啡酰类成分 3,5-二咖啡酰奎宁酸(C₂₅H₂₄O₁₂, 结构式见图 1)能促进原代培养的大脑皮层神经细胞体外存活作用, 并能对抗谷氨酸或高钾引起的大脑皮层神经细胞内钙超载从而促进细胞体外存活产生神经保护作用^[4-5]。

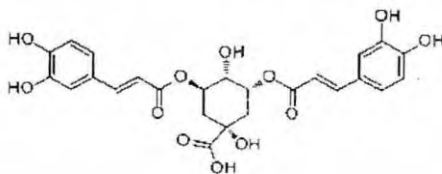


图 1 3,5-二咖啡酰奎宁酸结构式

同时基于前期研究提示药物的透血脑屏障能力是影响其直接发挥抗脑缺血损伤作用的关键因素, 本文拟探讨 3,5-二咖啡酰奎宁酸的透血脑屏障能力及其对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的影响, 以期对脑缺血保护创新药物研制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物 3,5-二咖啡酰奎宁酸标准品(纯度≥98%, 成都普思生物科技有限公司提供, 批号: PS08041001-01), 尼莫地平片(天津中央药业有限公司生产, 批号: 20120920), 灯盏细辛注射液(云南生物谷灯盏花药业有限公司, 批号: 20070811), 野黄芩苷(中国药品生物制品检定所, 批号: 110842-200403)。

1.2 动物 SD 乳鼠(出生 3~5d), SD 大鼠(全雄, 300±50g), 均由四川大学华西医学院实验动物中心, 合格证号: 川实动管第 71 号。

1.3 试剂 DMEM、F12、bFGF(均为 Gibco 产品), 胰酶(Gibco, 批号: 15050-065), II 型胶原蛋白酶(Gibco, 批号: 17101-015),

ECGS(Roche, 批号: 11033484-001), 胎牛血清(购自 Gibco), BSA(Roche, 分装), Percoll 细胞分离液(Pharmacia, 分装), HEPES(Amresco, 分装); 丙二醛(MDA)测试盒, 超氧化物歧化酶(SOD)测试盒, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒, 一氧化氮合酶(NOS)测试盒均购自南京建成生物工程研究所, 批号: 20131102。

1.4 仪器 CO₂ 培养箱(Thermo 3111), 倒置相差显微镜(Olympus IX70, Japan), 跨膜电阻测量仪(Millicell ERS, Millipore, USA), 透射电镜(Philips EM208s), Transwell 培养池(Millipore 公司, 0.4 μm PET), 与 24 孔培养板配合使用。日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10AV 紫外检测器, SCL-10A 系统控制器, CBL 恒温箱, N2000 色谱数据工作站, 氮吹仪(KL-512, 北京康林科技有限责任公司), 高速离心机(centrifuge 5417c, Eppendorf 公司), 超纯水仪(Millipore)等。

1.5 方法

1.5.1 体外透血脑屏障能力测定研究

样品制备 参照文献方法^[6,7], 选择试漏实验阳性的孔进行通透性实验, 向供池中加入野黄芩苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸(0.2 mg/ml)、灯盏细辛注射液稀释液(用培养液将原药液稀释 4 倍)各 300 μl, 受池中加 600 μl 星型胶质细胞培养液。在第 0、1、2、4、8 小时分别从受池中小心收集滤液各 100 μl、50 μl、50 μl、50 μl、50 μl 于 -20 ℃ 保存, 待所有取样结束后做样品处理。其中 0 小时为空白对照, 向供池内加入的药液为供池的起始浓度。将各样品氮气吹干(37 ℃), 分别向其中加入甲醇, 超声处理 20 min, 离心(5000 rpm × 10 min), 取上清液, 作 HPLC 分析供试品溶液。

HPLC 分析 色谱条件: 岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; 色谱柱: 十八烷基硅键合硅胶柱, 依利特 SinoChrom ODS-BP 5 μm(250 × 4.6 mm), 柱号: E1817666, 流速: 1 ml/min; 柱温: 室温; 流动相: 灯盏细辛注射液采用梯度程序(见表 1), 野黄芩苷和 3,5-二咖啡酰奎宁酸采用乙腈: 0.6% 甲酸(20: 80), 检测波长为 330 nm。

* 国家自然科学基金面上项目(NO. 30672602), 国家自然科学基金青年项目(NO. 81403311)

** 通讯作者

表1 灯盏细辛注射液 HPLC 梯度程序

时间(min)	流速(ml/min)	乙腈(%)	0.6%甲酸(%)
0.01	1.00	15.0	85.0
1.00	1.00	15.0	85.0
10.00	1.00	18.0	82.0
30.00	1.00	23.0	77.0
40.00	1.00	30.0	70.0
45.00	1.00	30.0	70.0
50.00	1.00	40.0	60.0
55.00	1.00	55.0	45.0
65.00	1.00	55.0	45.0

透过率计算 根据 HPLC 测定结果,取以下公式计算透过率^[6,7]。

$$P_{\text{药物}} \% = \frac{A_{\text{受池}} \times V_{\text{受池}}}{A_{\text{供池}} \times V_{\text{供池}}} \times 100\%$$

其中 $A_{\text{受池}}$ 为受池样品的峰面积, $A_{\text{供池}}$ 为供池峰面积, $V_{\text{受池}}$ 为受池体积, $V_{\text{供池}}$ 为供池体积。

1.5.2 药物对线栓法致大鼠脑缺血再灌注损伤的研究 3,5-二咖啡酰奎宁酸剂量确定参考文献^[8],其平均含量为 3.65 mg/g 药材。2005 年药典规定:灯盏细辛用于治疗脑缺血的剂量为:9~15 g/60 kg,按 15 g/60 kg 计算,相当于 3,5-二咖啡酰奎宁酸的临床用量 54.75 mg/60 kg。实验中 3,5-二咖啡酰奎宁酸分别设为临床用量的 20 倍、10 倍,用双蒸水溶解,超声助溶,高、低

剂量分别为 18.25 mg/kg、9.125 mg/kg。尼莫地平先将片研磨成粉,用双蒸水配制成浓度为 2 mg/ml 的尼莫地平液(乙醇助溶),给药容积为 10 ml/kg。

取 SD 大鼠 50 只,分模型组、假手术组、尼莫地平组、3,5-二咖啡酰奎宁酸高、低剂量组共 5 组,每组 10 只。造模前按体重灌胃给药 3 天,造模结束后给药 2 天,每天 1 次。腹腔注射 10% 水合氯醛 3.0~3.3 ml/kg 麻醉大鼠,采用线栓法阻塞大鼠中动脉制备 MCAO 大鼠模型^[9-12],术后保温至动物清醒。MCA 阻断 2 h 后,适当抽出线栓约 10 mm 进行再灌注。假手术组仅在颈动脉各处备线,待给予生理盐水后去线即可。造模 48h 后进行神经行为学评分,末次给药后将动物处死立即取全脑,进行 TTC 染色,测定脑梗死比率^[13],计算公式:脑梗死比率 = 梗死部分重量(g)/全脑重量(g);测定血清中 MDA、SOD、GSH-Px、NOS 的活性或含量,具体方法参照各试剂盒说明书。

2 结果

2.1 3,5-二咖啡酰奎宁酸的体外透血脑屏障能力测定

2.1.1 采用 HPLC 检测 3,5-二咖啡酰奎宁酸在灯盏细辛注射液中及单用对 BBB 的通透情况,结果见图 2、图 3,表 2、表 3。

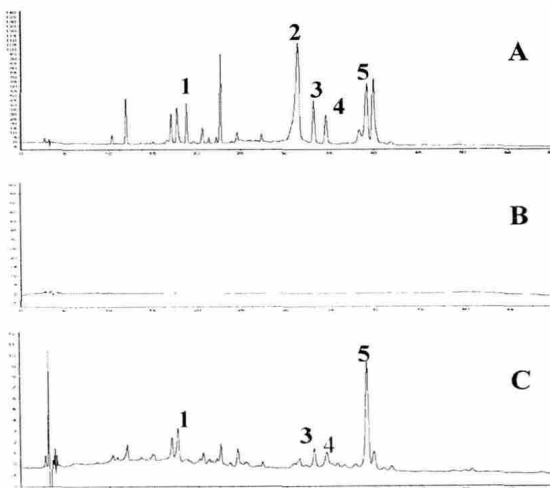


图2 灯盏细辛注射液的 HPLC 图谱

1: C1; 2: 野黄芩苷; 3: C2; 4: 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 5: 3,4-二咖啡酰奎宁酸

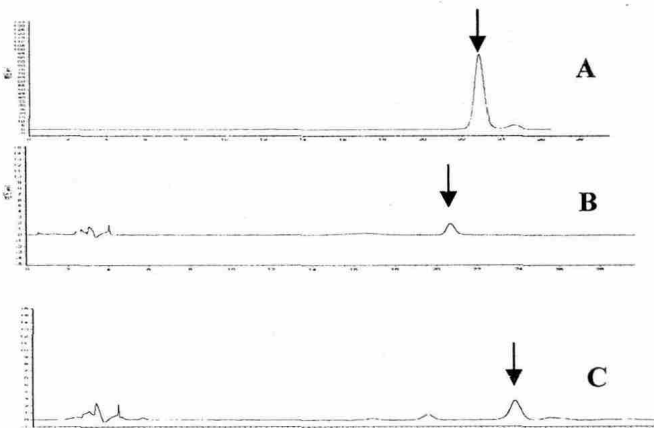


图3 3,5-二咖啡酰奎宁酸的 HPLC 图谱

A: 对照; B: 空白; C: 受池 8h

表2 灯盏细辛注射液中3,5-二咖啡酰奎宁酸对体外BBB的透过率

药物	供池峰	供池体积	8h 受池峰	受池体积	透过率
	面积	(μ l)	面积	(μ l)	
野黄芩苷对照	0	300	0	600	0
3,5-二咖啡酰奎宁酸	521019	300	51448	600	19.75

表3 3,5-二咖啡酰奎宁酸对体外BBB的透过率

药物	供池峰	供池体积	8h 受池峰	受池体积	透过率
	面积	(μ l)	面积	(μ l)	
野黄芩苷对照	0	300	0	600	0
3,5-二咖啡酰奎宁酸	256813.7	300	101640	600	79.15

从以上两表中可看出,与对照组相比,3,5-二咖啡酰奎宁酸均能透过血脑屏障,单用0.2 mg/ml对BBB的透过率可高达79.15%,而在灯盏细辛注射液中其透过率降低为19.75%,提示3,5-二咖啡酰奎宁酸单用能更好的透过BBB。

2.2 对线栓法致大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

2.2.1 脑缺血48h神经行为学评分 结果见表4。

表4 脑缺血48h神经功能缺失体征评分(n=10,分)

组别	剂量 (mg/kg)	症状/评分					mean rank
		无神经损伤不能完全伸	向左侧	向左侧	不能自发行走		
		症状	展左侧前爪	转圈	倾倒		
模型对照	0	4	5	1	0	37.55	
假手术对照	10	0	0	0	0	8.50**	
尼莫地平组	20	2	6	2	0	26.60*	
3,5-二咖啡酰奎宁酸	18.25	2	5	3	0	28.25	
3,5-二咖啡酰奎宁酸	9.13	2	6	2	0	26.60*	

与模型对照组相比 * P<0.05, ** P<0.01(下同)

表4结果表明,在脑缺血48h后,模型对照组出现明显的神经功能缺失体征;与模型组比较,尼莫地平组、3,5-二咖啡酰奎宁酸(9.13mg/kg)对模型动物神经功能缺失体征有较明显的改善作用。

2.2.2 大鼠脑梗死比率 TTC染色法表明各组TTC染色代表性照片见图4 统计结果见表5。

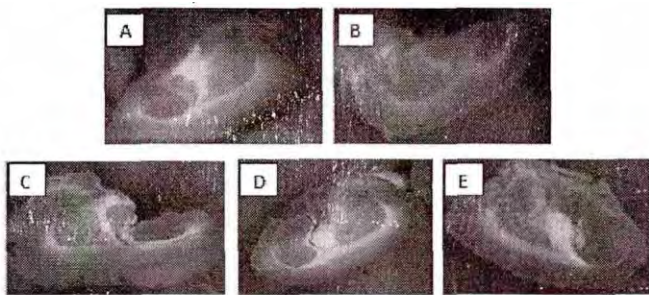


图4 各组TTC染色照片

A: 模型对照; B: 假手术; C: 尼莫地平组 20 mg/kg; D: 3,5-二咖啡酰奎宁酸 18.25 mg/kg; E: 3,5-二咖啡酰奎宁酸 9.13 mg/kg

表5 对大鼠脑梗死比率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	鼠数(只)	脑梗死比率(%)
模型对照		10	19.46 \pm 6.13
假手术对照		10	0.00 \pm 0.00**
尼莫地平	20	10	12.48 \pm 3.52**
3,5-二咖啡酰奎宁酸	18.25	10	13.52 \pm 5.02**
3,5-二咖啡酰奎宁酸	9.13	10	14.18 \pm 4.47**

从表5结果可看出,与模型对照组比较,其中尼莫地平 20

mg/kg及3,5-二咖啡酰奎宁酸(18.25、9.13 mg/kg)均能明显降低大鼠脑梗死比率。

2.2.3 大鼠血液生化指标 血清中MDA、SOD、GSH-Px、NOS含量统计结果见表6。

表6 对大鼠血清MDA、SOD、GSH-Px、NOS的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	MDA (nmol/ml)	SOD (u/ml)	GSH-Px (u/ml)	NOS (u/ml)
模型对照		4.56 \pm 0.38	1.23 \pm 0.15	378.28 \pm 14.50	26.23 \pm 3.04
假手术对照		2.58 \pm 0.65**	1.53 \pm 0.08**	486.35 \pm 15.31**	33.53 \pm 2.92*
尼莫地平	20	3.25 \pm 0.35**	1.45 \pm 0.07**	432.52 \pm 19.24**	30.32 \pm 2.34
3,5-二咖啡酰奎宁酸	18.25	2.69 \pm 0.39**	1.35 \pm 0.05*	418.47 \pm 25.21*	33.35 \pm 4.38*
3,5-二咖啡酰奎宁酸	9.13	2.98 \pm 0.72**	1.48 \pm 0.07**	409.23 \pm 22.15*	33.05 \pm 3.51*

表6中结果表明,与模型对照组比较,3,5-二咖啡酰奎宁酸不同剂量(18.25、9.13 mg/kg)均能不同程度降低MDA含量,同时增加SOD、GSH-Px、NOS的含量。

3 讨论

缺血性脑血管病最核心的问题是神经元损害引起的神经功能障碍,灯盏细辛注射液中黄酮类活性成分——野黄芩苷(灯盏花素注射液和灯盏花素片含量高达85%,可能是灯盏细辛治疗脑缺血的药效物质基础),前期研究显示较好的体外神经细胞保护作用^[2,5],但因不能很好的透BBB而不能直接到达效应器官发挥疗效^[14,15],可能通过抗氧化等其他途径发挥作用^[16]。另外由于在体研究药物的透血脑屏障能力,影响因素较多,且脑内药物浓度难以测量,故本文采用前期建立的原代大鼠脑微血管内皮细胞和星型胶质细胞共培养的体外BBB模型,结合HPLC分析方法评价了灯盏细辛注射液中3,5-二咖啡酰奎宁酸的透BBB能力。结果表明,3,5-二咖啡酰奎宁酸在灯盏细辛注射液中,对BBB的透过率较单用时明显降低,这与文献^[14,15]报道野黄芩苷不能很好的透BBB,且能减少血脑屏障的通透度相符。提示可能由于该注射液中野黄芩苷降低了血脑屏障的通透性,导致其他活性组分的透过率降低从而影响疗效,故3,5-二咖啡酰奎宁酸可能成为灯盏细辛中透BBB的抗脑缺血活性成分。

本文进一步采用大鼠线栓法致脑缺血再灌注损伤模型,考察了3,5-二咖啡酰奎宁酸的神经保护作用。研究结果表明,3,5-二咖啡酰奎宁酸可改善模型大鼠的神经行为学评分,降低脑梗死比率,通过增加脑缺血模型大鼠SOD、GSH-Px、NOS活性,降低MDA含量等途径,对线栓法阻塞MCA致大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤产生不同程度的保护作用,表明灯盏细辛中咖啡酰类活性成分3,5-二咖啡酰奎宁酸很可能成为理想的抗脑缺血损伤药物。

参考文献

- 1 杨文宇,张艺.灯盏细辛民族民间用药研究概况.成都中医药大学学报 2005;28(1): 63~64
- 2 张静,盛艳梅,张艺.灯盏细辛注射液对大鼠大脑皮层神经元细胞存活率的影响.中药药理与临床 2007;23(5): 135~136
- 3 尹明华,徐晓虹.灯盏花素对缺血性记忆障碍和血脑屏障的保护作用.浙江师范大学学报 2008;31(1): 76~80

- 4 盛艳梅,张静,罗维早,等.咖啡酸及其衍生物对体外培养大鼠大脑皮层神经细胞的影响.中国医院药学杂志 2009;29(12): 969~971
- 5 张静,王毓杰,盛艳梅,等.灯盏细辛保护神经活性成分的研究.华西药理学杂志 2011;26(3): 208~211
- 6 盛艳梅,张静,孟宪丽,等.灯盏乙素乙酯的体外脑缺血神经保护活性及其作用机制.中国药理学杂志 2012;47(15): 1212~1215
- 7 高永红,王永炎,肖盛元,等.清开灵有效组分透过体外模拟血脑屏障的研究.北京中医药大学学报 2005;28(2): 26~28
- 8 盛艳梅,孟宪丽,李春雨,等.HPLC法测定灯盏细辛中3,5-双咖啡酰氧基奎宁酸的含量.中国预防医学杂志.2005;6(3): 216~217
- 9 刘喆,赖新生.大脑中动脉闭塞脑缺血模型大鼠的建立与评价.中国行为医学科学 2005;14(10): 877~881
- 10 石将通,赵忠,蒙息标,等.线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型手术操作的研究进展.中国比较医学杂志 2014;24(7): 68~71
- 11 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学.人民卫生出版社.第3版,2001: 1060~1068
- 12 马志健,罗刚,易西南.脑缺血再灌注动物模型的制备及评价.2009;15(6): 556~559
- 13 盛艳梅,孟宪丽,李春雨,等.川芎挥发油对大鼠大脑皮层神经细胞的保护作用及脑缺血再灌注损伤的影响.时珍国医国药 2012;23(3): 536~538
- 14 Hu X. M, Zhou M. M, Zeng F. D. Neuroprotective effects of scutellarin on rat neuronal damage induced by cerebral ischemia reperfusion. Acta Pharmacol Sin 2005;26(12): 1454~1459
- 15 卢晓梅,赵红,张海鹏.灯盏花素对脑缺血再灌注小鼠明胶酶及血脑屏障通透性的影响.中国医科大学学报 2006;35(5): 481~483
- 16 邹远萍.灯盏花素注射液对短暂性脑缺血发作患者血液流变学指标的影响.微循环学杂志 2006;16(4): 77~77

Study of 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid on penetrating the blood-brain barrier in vitro and inhibiting cerebral ischemic reperfusion injury in rats

Sheng Yanmei, Tang Shaowei, Zhang Jing¹, Zhang Yi^{1**}

(Department of Pharmacology, Chengdu Medical College, Chengdu 610500; ¹ Chengdu University of TCM, Chengdu 610075)

Objective: To explore the effect of 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid on ischemic reperfusion injury in rats and the ability cross blood-brain barrier (BBB) in vitro. **Methods:** Blood brain barrier model was established and the active component was detected by HPLC. The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was built by suture embolism in rats after rats were administered for 3 days. The rats were administered for two more days, then the nerve function score was recorded cerebral infarction proportion SOD, MDA, GSH-Px and NOS in rats blood serum were detected. **Results:** Compared with control group, the ability to penetrate BBB of 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid (0.2 mg/ml) is much higher than that of erigeron injection. Compared with model group, 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid (18.25, 9.13 mg/kg) can decrease cerebral infarction ratio and score, enhance the activities of SOD, GSH-Px, NOS and decrease the content of MDA in rats (P < 0.05, 0.01). **Conclusion:** These findings indicate that 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid could cross BBB well and decrease cerebral infarction proportion; enhance the activities of SOD, GSH-Px, NOS; decrease the content of MDA and improve neurologic injury in rats. Therefore, 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid could relieve the damages caused by ischemic reperfusion injury.

Key words 3,5-di-o-caffeoyl quinic acid; cerebral ischemic reperfusion; blood-brain barrier

龙葵素通过 ROS 激活 p38 信号通路诱导人前列腺癌 Du145 细胞凋亡*

钟伟枫^{1,2}, 刘思平², 姚史武², 林毅锋², 何强², 赖彩永³, 周芳坚^{1**}

(¹中山大学肿瘤防治中心泌尿外科, 广州 510060; ²广东省梅州市人民医院泌尿外科, 梅州 514021;

³暨南大学附属第一医院泌尿外科, 广州 510630)

摘要 目的: 探讨龙葵素对前列腺癌细胞 Du145 凋亡的分子机制。方法: 应用 MTT 法检测龙葵素对 Du145 细胞活力的影响, 流式细胞仪检测龙葵素对 Du145 细胞中活性氧的生成及细胞凋亡的影响, Western blot 法检测龙葵素对细胞内 p38 和 p-p38 蛋白表达的影响。结果: 10、20、40、80、160 μg/ml 龙葵素作用细胞 24h 后, 细胞活力呈浓度依赖性降低。ROS 抑制剂 (NAC) 预处理细胞 1h 能显著抑制龙葵素对细胞活力的抑制作用。40 μg/ml 龙葵素作用细胞 24h 能促进细胞 ROS 生成和细胞凋亡, 细胞凋亡率为 (31.0 ± 0.8)% 与正常对照组相比具有显著统计学差异; 龙葵素能促进 p38 磷酸化水平为 (2.40 ± 0.22) 倍, 与正常对照组相比具有显著统计学差异。p38 磷酸化抑制剂和 NAC 均能显著抑制龙葵素诱导的细胞凋亡和 p38 的磷酸化。结论: 龙葵素可诱导 Du145

* 基金项目: 广州市医药卫生科技项目 (20141A010105); 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2014383); 广东省自然科学基金 - 博士启动项目 (2015A030310250) ** 通讯作者