

新型天麻素衍生物对大鼠脑缺血/再灌注损伤的治疗作用及安全性评价

杨小佳¹,毛晓娜¹,郑紫星¹,陈 维²,杜俊蓉^{1*}

¹四川大学华西药学院;²四川省中医药科学院,成都 610041

摘要:研究天麻素(Gas)及新型天麻素衍生物(Gas-D)对大鼠脑缺血/再灌注后神经行为损伤和脑梗死体积的影响以及安全性评价。采用Wistar雄性大鼠建立脑缺血/再灌注损伤模型(MCAO模型),大鼠随机分6组,假手术组(Sham)、模型组(Model)、Gas 50(Gas 50 mg/kg)组(一次给药)、Gas 50(Gas 50 mg/kg)组(二次给药)、Gas-D 50(Gas-D 50 mg/kg)组(一次给药)、Gas-D 50(Gas-D 50 mg/kg)组(二次给药),通过神经行为学评分和TTC染色探讨Gas-D对脑缺血/再灌注损伤的治疗作用;ICR小鼠随机分2组,雌雄各6只,分别腹腔给予2.0 g/kg剂量的Gas、Gas-D,记录小鼠1、7、14天体重和死亡情况。结果表明Gas-D 50组(二次给药)对脑缺血/再灌注损伤后大鼠的神经行为损伤和脑梗死体积均有显著的改善作用,且优于其他组;急性毒性实验中,Gas-D组没有死亡,具有安全范围广,毒性低,给药剂量空间大的优势。

关键词:脑缺血;再灌注损伤;天麻素;天麻素衍生物

中图分类号:R966

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.024

The Therapeutic Effects of Novel Gastrodin Derivative on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats and Safety Evaluation

YANG Xiao-jia¹, MAO Xiao-na¹, ZHENG Zi-xing¹, CHEN Chu², DU Jun-rong^{1*}

¹West China School of Pharmacy, Sichuan University, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences;

²Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: The aim of this study is to observe the effects of gastrodin (Gas) and new gastrodin derivative (Gas-D) on neurological deficit and cerebral infarct volume after cerebral ischemia/reperfusion in rats and the safety evaluation. Cerebral ischemia/reperfusion rat model was induced by the modified middle cerebral artery occlusion method. The rats were randomly divided into 6 groups: Sham group; Model group; Gas 50 (Gas 50 mg/kg) group (one time); Gas 50 (Gas 50 mg/kg) group (two times); Gas-D 50 (Gas-D 50 mg/kg) group (one time); Gas-D 50 (Gas-D 50 mg/kg) group (two times). The role of Gas-D on brain injury was evaluated by the neurological deficit scores and TTC staining. ICR mice were randomly divided into 2 groups, 6 males and females per group. They were given intraperitoneally 2.0 g/kg Gas and Gas-D. Activity, diet consumption, mental condition, body weight and deaths were recorded at 1, 7, 14 d after treatment. The results showed that Gas-D 50 group (two times) improved neurological function and reduced the infarct volume. In acute toxicity experiments, there are no dead mice in Gas-D group at dose of 2.0 g/kg. The findings showed that Gas-D had neuroprotective effects and low toxicity.

Key words: cerebral ischemia; reperfusion injury; gastrodin; gastrodin derivative

脑卒中是成年人残疾和死亡的主要原因,每年约有600万例死亡,具有严重的社会负担^[1]。其中缺血性脑卒中占大多数,虽然急性时间窗口内的治疗方法已经得到改善,但是长期的治疗方法非常有

限。因此,加强脑卒中的防治策略及促进卒中后康复从而改善患者生活质量,是全世界关注的重大研究课题。

天麻也称赤箭或明天麻,始载于神农本草经,为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎^[2]。天麻的成分包括酚类、多糖类、甾醇类和有机酸类等,天麻素(Gastrodin, Gas)是天麻的主要活性成分之一,具有抗惊厥、镇痛、降压及保护神经细胞等作

用^[3,4]。虽然天麻素及其相关产品已经在临床上得到了广泛应用,但天麻素是酚苷类化合物,水溶性强,不易透过血脑屏障,因此在中枢神经系统中浓度低,活性弱^[5]。为了增强天麻素抗脑缺血的疗效,我们合成了一系列天麻素衍生物(Gastrodin derivative, Gas-D),以期发现活性更强、疗效更佳的备选药物。初步研究发现, Gas-D 对脑缺血/再灌注大鼠的神经行为损伤和脑梗塞体积均有显著的改善作用。急性毒性实验中, Gas-D 组在 2.0 g/kg 剂量下没有出现死亡,提示其在脑卒中疾病治疗中具有进一步的研究价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重 320 ~ 350 g; ICR 小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 购自四川省成都市达硕生物技术有限公司, 合格证号: SYXK (川) 2014-189。常规饲养, 自由饮水与摄食, 饲养环境温度维持 24 ± 1 °C, 相对湿度 50% 左右。

1.2 试剂及仪器

Gas, Gas-D 纯度 > 99%, (四川省中医药科学院提供)、二甲基亚砜(天津市瑞金特化学品有限公司, 批号 20160422)、吐温 80(天津市津鑫化学试剂厂, 批号 20150915)、栓线 2838(北京西浓科技公司)、氯代三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC) (Sigma, 批号 BCBR5461); SS20-2 型动物体温维持仪(安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司)、moorVMS-LDF2-多普勒血流仪(Moor Instruments Ltd)、牙科钻(SAESHIN PRECISION IND. CO.)、电子天平(上海卓精电子科技有限公司)。

1.3 实验动物分组

将大鼠分为 6 组: 溶媒(Sham)组和模型(Model)组、Gas 50 组(一次给药)、Gas 50 组(二次给药)、Gas-D 50 组(一次给药)和 Gas-D 50 组(二次给药)。

急性毒性实验: 将小鼠禁食 12 h 后称重, 同一性别随机分组为 Gas 组和 Gas-D 组, 每组雌雄各 6 只。

1.4 脑缺血/再灌注模型的建立

本实验参照 Longa 法^[6], 腹腔注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠后, 制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。术中大鼠体温始终维持在 37 °C。Sham 组除不插入栓线外, 其余操作过程与 Model 组相同。

1.5 局部脑血流(CBF)的测定

LDF 的测定原理和基本方法参照文献简述。大鼠俯卧位固定于立体定位仪上, 开颅窗, 以前囟为坐标原点, 选择前囟 2 mm, 右侧 3 mm 为测定点, 用牙科钻打薄 2 ~ 3 mm 区域, 保持硬脑膜的完整性并避开较大血管, 定位并固定好探头座^[7,8]。线栓插入 ICA 时, 稳定 LDF 读数后, 记录 2 min 内的血流值, 以其平均值作为脑血流的基础值(100%), 完成 MCAO 手术后, 脑血流值降至基础值的 20% 以下, 证明大脑中动脉血流已被阻断, 确定模型成功^[9]。

1.6 给药方法及剂量

Gas 分子式为 C₁₃H₁₈O₇, 分子量为 286; Gas-D 分子式为 C₁₇H₁₆O₅, 分子量为 300, 二者结构式见图 1。两者均为白色粉末, 经高效液相色谱鉴定其纯度均 > 99%, 见图 2。Gas, Gas-D 溶于二甲基亚砜(0.2%)、吐温 80(3%)中, 充分混匀后, 用灭菌生理盐水重悬。给药剂量为 50 mg/kg, 给药体积为 1 mL/100 g。给药方式分为两种: (1)再灌后 10 h, 一次腹腔注射给予(一次给药); (2)再灌同时和再灌后 10 h 时, 两次腹腔注射给予(二次给药)。

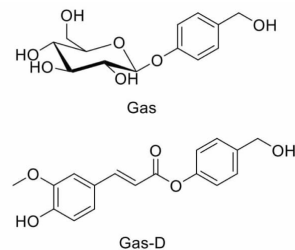


图 1 Gas 和 Gas-D 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of Gas and Gas-D

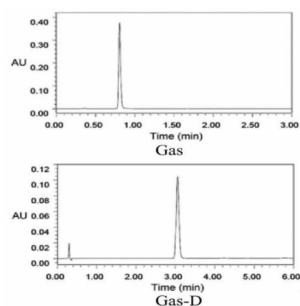


图 2 Gas 和 Gas-D 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of Gas and Gas-D

1.7 小鼠急性毒性试验的建立

Gas, Gas-D 溶于二甲基亚砜(0.2%)、吐温 80(3%)中, 充分混匀后, 用灭菌生理盐水重悬。给药

体积为 0.1 mL/10 g, 给药剂量为 2.0 g/kg, 腹腔注射给药。给药后 2 h 内密切观察小鼠状态, 之后每两小时观察一次。若无异常, 从给药后第二天起早晚各观察一次。正常饲养, 连续观察 14 天, 密切注意小鼠活动、饮食及精神状况并记录小鼠第 1、7、14 天体重和死亡情况。在观察结束后解剖存活的小鼠。查看其内脏情况^[10]。

1.8 神经行为学评分

缺血 2 h 及再灌注 22 h, 参照 Longa 法^[6] 对大鼠进行神经行为学评分: 0 分: 无症状; 1 分: 右前肢不能完全伸展; 2 分: 向右侧转圈; 3 分: 行走或静止时向右侧倾倒; 4 分: 不能自主活动; 5 分: 死亡。缺血 2 h 后 2 分及 2 分以上的大鼠纳入后继的实验组, 除去死亡和评分不达标的大鼠, 保证每组有 6 只。

1.9 脑梗塞体积测定^[11]

再灌注 22 h 后, 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 用生理盐水灌流, 取出大脑冷冻于 -20 ℃。大约 1 h 后, 从冰箱 -20 ℃ 取出大脑, 待其稍微解冻片刻, 用刀片沿冠状面从额叶到枕叶依次切成 7 片 2 mm 厚的脑片。将脑片放入 1% TTC 染色液中, 在 37 ℃ 水浴避

光孵育 20 min(途中轻轻翻转脑片 1 次), 取出后可见梗死区域呈白色, 而正常组织为红色。用 4% 多聚甲醛溶液将染色后的脑片固定 24 h, 吸干液体, 将其按顺序放在蓝色背景下等间隔排列后拍照。用图像分析系统软件 Image-Pro puls 6.0 处理并统计, 计算脑梗塞体积百分比。

1.10 数据处理与分析

实验数据均以 Mean ± SD 表示, 实验结果采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 两组间采用独立样本 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为显著性差异。

2 结果

2.1 Gas 和 Gas-D 对大鼠神经行为损伤的影响

再灌注 22 h 后, 进行神经行为学评分。Model 组的大鼠出现明显的神经运动功能障碍, 其主要表现: 提尾时, 右前肢不能完全伸直、肩内旋、肌张力降低; 爬行时, 向右侧划圈、追尾、甚至倾倒或不能自主行走。与 Model 组相比较, Gas-D 50 组(二次给药)大鼠的神经行为损伤得到显著改善(***P* < 0.01), 其他组无明显改善(见表 1)。

表 1 Gas 和 Gas-D 对大鼠神经行为损伤的影响(*n* = 6, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Gas and Gas-D on neurobehavioral deficits(*n* = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	例数 Number	缺血 2 h 神经功能评分 Neurobehavioral scores of 2 h after ischemia	再灌注 22 h 神经功能评分 Neurobehavioral scores of 22 h after reperfusion
对照组 Sham group	6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
模型组 Model group	6	2.50 ± 0.55	2.50 ± 0.55
Gas 50 组一次给药 Gas 50 group one time administration	6	2.33 ± 0.52	2.33 ± 0.52
Gas 50 组二次给药 Gas50 group two times administration	6	2.50 ± 0.52	2.33 ± 0.52
Gas-D 50 组一次给药 Gas-D 50 group one time administration	6	2.50 ± 0.52	2.33 ± 0.52
Gas-D 50 组二次给药 Gas-D 50 group two times administration	6	2.50 ± 0.52	1.17 ± 0.41 * *

注: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs 模型组。

Note: vs model group, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.

2.2 Gas 和 Gas-D 对大鼠脑梗死体积的影响

TTC 染色结果显示缺血区呈白色, 非缺血区呈红色。Sham 组大鼠脑组织呈红色, 无梗死区。Model 组缺血 24 h 后大鼠缺血侧脑冠状切片出现明显的梗死, 梗死部位主要集中在缺血侧的皮层以及皮层下的纹状体区域。给予 Gas 和 Gas-D 后, Gas-D 50 组(二次给药)梗死体积显著减小, 与 Model 组比较有显著性差异(***P* < 0.01), 其他组无差异。见

图 3。造模后, 大鼠的死亡情况见图 4。Sham 组的死亡率为 0, Model 组的死亡率为 33.3%, Gas 50(一次给药)组、Gas 50(二次给药)组、Gas-D 50(一次给药)组的死亡率均为 25%, Gas-D 50(二次给药)组的死亡率为 14.3%。

2.3 CBF 的测定结果

脑血流阻断是造成脑部梗死的直接原因。缺血前基础值约为 100%, 缺血后血流值迅速降至 20%

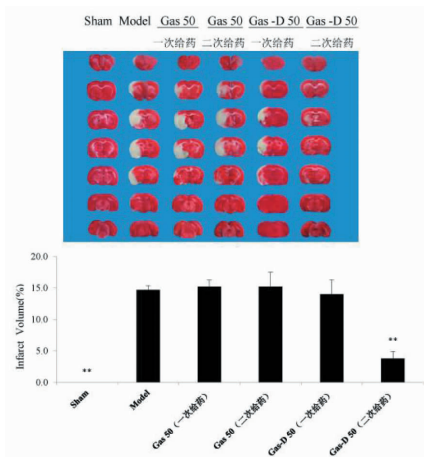


图3 Gas 和 Gas-D 对大鼠脑梗塞体积的影响

Fig. 3 Effects of Gas and Gas-D on infarct volume in MCAO rats

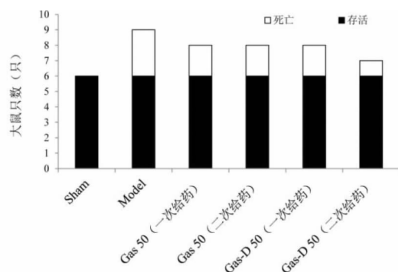


图4 造模后大鼠的死亡情况

Fig. 4 The death of rats after the MCAO

以下,证明大脑中动脉已阻断,模型成功,再灌注后迅速恢复至80%,见图5。

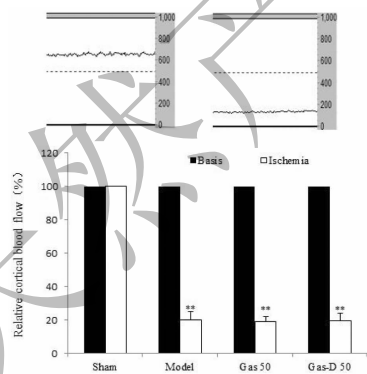


图5 大鼠缺血前和缺血后 CBF 值

Fig. 5 CBF values of before and after occlusion in transient MCAO rats

2.4 Gas 和 Gas-D 对 ICR 小鼠活动、饮食、精神状况及内脏等的影响

14 天的观察期间中,在 2.0 g/kg 剂量下,两组

ICR 雌性和雄性小鼠的饮食、活动及精神状况均未出现药物中毒时所表现出的中毒标志和症状,且它们的毛色洁白光滑,皮肤、眼睛、呼吸等均都正常,同时各组动物在该给药剂量下均未出现死亡的情况。尸检并未发现脏器损伤。

2.5 Gas 和 Gas-D 对 ICR 小鼠体重的影响

14 天实验期内, Gas 组和 Gas-D 两组小鼠体重都明显增加,且增加的体重基本相同(与第 1 天比,第 7 天和 14 天体重, $** P < 0.01$)(见图 6)。

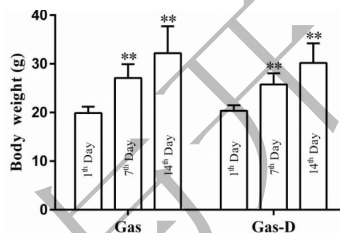


图6 Gas、Gas-D 组对 ICR 小鼠体重的影响

Fig. 6 Effects of Gas and Gas-D on body weight gain in ICR mice

3 讨论

近期研究表明,天麻素在中枢神经系统、心血管系统和免疫系统方面具有广泛的药理作用,毒副作用少,且对缺血再灌注脑损伤具有保护作用^[13],但天麻素属于酚苷类化合物,存在活性不强、不易透过血脑屏障等缺点,本文中的天麻素衍生物则是天麻苷元和阿魏酸合成的酯类衍生物,旨在发现更好更强的具有抗脑缺血治疗作用的药物。

人类缺血性脑卒中疾病中,大脑中动脉及其分支是最容易受影响的脑血管,约占 70%,因此,闭塞此动脉的卒中模型最接近人类缺血性脑卒中^[14,15]。建模方式一般包括开颅手术法、微栓子栓塞法、光化学诱导血栓形成法、血管内线栓法等。其中线栓法由于具有缺血部位相对恒定、缺血和再灌注时间可以准确控制、操作简单、对动物影响较小等优点,成为目前应用最广泛的方法。但是由于大鼠血管的个体差异,导致模型不稳定。LDF 技术可以在创伤很小的条件下,进行局部脑血流实时监测。当中动脉被阻断后,血流值迅速降至基础血流值的 20% 以下,确保模型成功。

神经行为学和脑梗塞体积是脑缺血损伤程度最直接的指标。脑卒中病人的临床表现为突然发生口眼歪斜、半身不遂、舌强言蹇、智力障碍等主要特征。大鼠脑卒中主要表现为同侧眼裂变窄、对侧肢体屈曲、不能自主行走甚至死亡。再灌注后 22 h,我们采

用经典的 Longa 法^[6]对大鼠神经行为学进行评分来判断大鼠的神经行为损伤程度,结果显示 Gas-D 50 组(二次给药)能改善脑缺血/再灌注急性期神经行为损伤,而 Gas 50 组(一次给药)、Gas 50 组(二次给药)、Gas-D 50 组(一次给药)与 Model 组相比无明显差异。

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)是脂溶性光敏感复合物,1894年首次合成用于检测种子的生存能力,1958年开始用来染色,检测哺乳动物组织的缺血梗死^[16]。正常组织活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶还原 TTC 生成红色的还原产物甲月赞,而缺血组织的细胞凋亡坏死,导致细胞内琥珀酸脱氢酶的活性消失或下降, TTC 不能被还原,所以死亡组织变成白色^[17]。因为 TTC 染色简便、快捷、廉价,能够快速准确的分辨缺血区和非缺血区,因此被广泛用于动物组织缺血梗死的检测^[11]。实验结果显示, Model 组左侧大脑中动脉支配的视前区、纹状体、皮层及皮层下白质呈现苍白色的梗死状态, Gas-D 50 组(二次给药)梗死体积明显小于 Model 组,而 Gas 50 组(一次给药)、Gas 50 组(二次给药)、Gas-D 50 组(一次给药)与 Model 组相比无明显差异,这表明 Gas-D 50 组(二次给药)能够减轻脑缺血/再灌注损伤。

大鼠缺血再灌后 10 h 一次给药, Gas 和 Gas-D 对脑缺血均无保护作用;再灌同时和再灌后 10 h 两次给药, Gas-D 能够改善神经功能障碍、减小梗死体积,对脑缺血有保护作用,而 Gas 对脑缺血没有保护作用。急性毒性实验表明 Gas-D 的安全范围较广。综上所述,和 Gas 相比, Gas-D 对脑缺血具有更强的保护作用,且安全范围广,给药剂量空间大,具有进一步研究开发的意义与价值。

参考文献

- Mozaffarian D, Benjamin EJ, *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2016 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133:447-454.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: Vol I.
- Liu W, Su BL, Wang ZS, *et al.* Gastrodin improved baroreflex sensitivity and increased gamma-amino butyric acid content in brains without decreasing blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *CNS Neurosci Therap*, 2012, 18: 873-875.
- Wang Y, Wu Z, Liu X, *et al.* Gastrodin ameliorates Parkinson's disease by down regulating connexin 43 [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8:585-590.
- Wang Q, Chen GS, Zeng S. Distribution and metabolism of gastrodin in rat brain [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2008, 46: 399-404.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz, *et al.* Continuous measure of cerebral cortical blood flow by laser-doppler flowmetry in a rat stroke model [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1989, 9: 589-596.
- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edition [M]. New York: Academic Press, 1986.
- Wang P, Guan YF, Du H, *et al.* Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemic stroke [J]. *Autophagy*, 2012, 8(1):77-87.
- Bimit M, Jung WC, In H, *et al.* Physicochemical characterization and toxicity of decursin and their derivatives from *Angelica gigas* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35:1084-1090.
- Okuno S, akase H N, akak T S. Comparative study of 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) and hematoxylin-eosin in staining for quantification of early brain ischemic injury in rats [J]. *Neurol Res*, 2001, 23:657-661.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, *et al.* Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans [J]. *Stroke*, 1976, 7(1):46-53.
- Liu B, Li F, Shi JS, *et al.* Gastrodin ameliorates subacute phase cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and apoptosis in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14:4144-4152.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, *et al.* Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in which recirculation can be introduced into the ischemic area [J]. *Stroke*, 1986, 8(1):1-8.
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, *et al.* Focal cerebral ischaemia in the rat: I. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1(1):53-60.
- Bederson J B, Pitts L H, Germano S M, *et al.* Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification [J]. *Stroke*, 1986, 17:1304-1308.
- Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts [J]. *Brain Res*, 2004, 13(1):7-11.