

红景天苷对脑缺血再灌注模型大鼠的治疗作用及其在脑组织中的动态含量研究

曹慧, 宋玉晨, 张颖, 郑晓宇, 宋文婷 (中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京市中药药理重点实验室, 北京 100091)

摘要: **目的** 探究红景天苷在缺血再灌注大鼠脑组织及血浆中的分布规律, 阐明并验证红景天苷可能的起效部位。 **方法** 建立大鼠大脑中动脉栓塞模型, 分为红景天苷高、中、低剂量(10、5、2.5 mg·kg⁻¹)药效实验组及红景天苷药代实验组(15 mg·kg⁻¹)。药代组于缺血后 15、40、120 min 3 个时间点分别取血并灌注取脑, LC-MS 检测脑组织及血浆中红景天苷的含量。药效实验各组于缺血 24 h 后取脑, 氯化三苯基四氮唑(TTC)法检测脑梗死面积; ELISA 法检测血浆中组织因子(TF)的表达。体外观察红景天苷对氧糖剥夺(OGD)后人脑微血管内皮细胞(HCMEC)的保护作用, CCK-8 法检测细胞活力, 试剂盒检测细胞上清中一氧化氮(NO)的含量。 **结果** 与正常组比较, 模型组大鼠出现明显的梗死灶 ($P < 0.01$), 红景天苷高、中、低剂量组可明显减少缺血后的脑梗死面积($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且各剂量的红景天苷可明显减轻氧糖剥夺造成的内皮损伤($P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠组织因子明显升高($P < 0.01$); 而与模型组比, 红景天苷高、低剂量组组织因子表达明显降低($P < 0.01$)。造模后脑组织与血浆中红景天苷于 15 min 达到最高值, 左、右脑组织中红景天苷含量无明显差异, 各时间点脑/血比值均低于 0.1。 **结论** 红景天苷在缺血性中风急性期脑组织中的分布有限, 但红景天苷可能通过保护血液侧的内皮细胞而发挥脑保护作用。

关键词: 红景天苷; 脑缺血再灌注; 药代动力学; 脑分布; 脑保护; 人脑微血管内皮细胞(HCMEC); 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0180-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.006

Therapeutic Effect of Salidroside on Cerebral Ischemia Reperfusion Model Rats and Its Dynamic Content in Brain Tissue

CAO Hui, SONG Yuchen, ZHANG Ying, ZHENG Xiaoyu, SONG Wenting (Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution pattern of salidroside in brain tissue and plasma of ischemia-reperfusion rats, to clarify the active site of salidroside. **Methods** After rat models of middle cerebral artery occlusion were built, rats were divided into salidroside high-, medium-, and low-dose groups (10, 5, and 2.5 mg·kg⁻¹) and a pharmacokinetic group (15 mg·kg⁻¹). Blood was collected at 3 time points (15, 40, and 120 min) after ischemia, and the brain was taken out after reperfusion in the pharmacokinetic group. The levels of salidroside in brain and plasma were detected by LC-MS. The brains of salidroside high-, medium-, and low-dose groups were removed after 24 h of ischemia, and the cerebral infarct size was detected by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) assay. Tissue factor (TF) expression in plasma was measured by ELISA. Besides, the protective effects of salidroside on human cerebral microvascular endothelial cells (HCMEC) after oxygen glucose deprivation (OGD) *in vitro* were

收稿日期: 2021-09-30

作者简介: 曹慧, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 从事脑保护中药药理研究。Email: 1014641950@qq.com。通信作者: 宋文婷, 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 脑血管研究、中药新药研发。Email: wenting_song1@163.com。

基金项目: 中央公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZZ13-YQ-007); 国家自然科学基金青年项目(81603617)。

investigated, the cell viability was detected by CCK-8, and the content of NO in the cell supernatant was examined by NO assay kit. **Results** Compared with normal group, the rats in the model group showed obvious infarct lesion ($P < 0.01$). The high-, middle- and low-dose salidroside groups could prominently reduce the infarct size after ischemia ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and significantly attenuated OGD-induced endothelial injury ($P < 0.01$). Tissue factor was significantly increased in the model group as compared with the normal group ($P < 0.01$), whereas TF expression in the high- and low-dose salidroside groups was significantly decreased as compared with the model group ($P < 0.01$). The concentration of salidroside in the brain tissue and plasma reached the highest value at 15 min, and there was no significant difference between the levels of salidroside in the right- and left-brain tissues. The brain-blood ratio was lower than 0.1 at each time point. **Conclusion** The results indicated that although the distribution of salidroside in the brain tissue was limited during the acute phase of ischemic stroke, salidroside may exert a brain protective effect by protecting endothelial cells near the blood side.

Keywords: Salidroside; cerebral ischemia-reperfusion; pharmacokinetics; brain distribution; cerebral protection; human cerebral microvascular endothelial cells(HCMEC); rats

红景天是景天科植物大花红景天的干燥根及根茎, 具有益气活血、通脉平喘之功效; 红景天苷(Salidroside, sal, $C_{14}H_{20}O_7$) 是其主要活性成分之一, 具有抗疲劳、抗氧化、保护心脑血管系统、抗肿瘤、抗哮喘等多种生物活性^[1]。近年研究^[2-4]结果显示, 红景天苷具有明确的活血、抗血栓形成作用, 对缺血后的神经损伤具有明显的治疗作用。红景天苷在大鼠体内的药代动力学研究^[5-6]结果表明, 无论口服还是静脉给药, 其在脑组织中的分布均有限。红景天苷在缺血再灌注模型鼠体内的药代动力学未见研究, 缺血再灌注后红景天苷能否进入脑实质发挥脑保护作用的起效部位尚不明确。

药物要想进入脑实质发挥作用, 必须透过血脑屏障。血脑屏障是存在于血液与脑组织之间存在的天然屏障, 在保护中枢神经系统免受外界损害的同时限制了大多数药物的入脑转运, 有研究^[7]称约 98% 的药物小分子难以透过血脑屏障, 大分子几乎全部无法透过血脑屏障。内皮细胞是血脑屏障的主要组成部分^[8], 具有亲脂性, 所以在正常的状态下, 亲水性的红景天苷很难透过内皮细胞。内皮细胞参与调节脑内外分子通过, 也参与止血及抗血栓形成, 对维持脑内稳态具有重要作用^[9]。缺血缺氧会导致内皮损伤, 内皮功能受到破坏, 脑内外分子流通失调, 大量血液中的毒性成分透过内皮渗入脑组织, 改变脑内微环境, 造成脑损伤^[10-11]。因此, 在缺血缺氧后, 红景天苷可能有机会透过受损的内皮, 进入脑实质发挥作用。但也有可能即使缺血后出现血脑屏障损伤, 红景天苷也无法透过血脑屏障, 仅能存在于血液中。

基于以上两种可能, 本研究首先观察红景天苷对缺血再灌注大鼠的治疗作用, 再利用 LC-MS 检测缺血再灌注大鼠脑组织及血浆中红景天苷的含量, 结合含量检测结果设计验证实验。以期通过药效、含量检测及验证实验, 探究红景天苷发挥脑保护作用的起效部位, 为红景天苷治疗缺血性中风的药理机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞 SD 雄性大鼠, 体质量 210~230 g, SPF 级, 8 周龄, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(京)2019-0010, 质量合格证号: 110324211104241277。饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心, 使用许可证号: SYXK(京)2018-0018。于温度 23~25 ℃, 湿度 50%~70% 的恒温、恒湿环境饲养, 12 h 交替照明。本实验经中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批通过, 编号: 2018XLC003-2。

人脑微血管内皮细胞(human cerebral microvascular endothelial cells, HCMEC), 购于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司, 货号: iCell001。

1.2 药物及试剂 红景天苷, 批号: RFS-HO4001911021, 购于成都瑞芬思生物科技有限公司, 纯度大于 98%。DMEM 培养基, 赛默飞世尔科技, 批号: 11966025; HCMEC/D3 基础培养基, 赛百慷(上海)生物技术股份有限公司, 批号: h070; 氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC), 中国医药上海化学试剂公司, 批号: 20031212; CCK-8 细胞检测剂, 东仁化学科技有限公司, 批号: nw595;

NO 检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司, 批号: 0021s; TF 检测试剂盒, 睿瀛生物技术有限公司, 批号: B6501; 对乙酰氨基酚, 中国药品生物制品检定所, 批号: 100018-200408; 甲醇(批号: I1099307 025)、乙腈(批号: SHBM7822)、甲酸(批号: 0J0921)均为色谱纯, 德国 Merck 公司。

1.3 仪器 2432-A1JC 型 MCAO 栓线, 北京西浓科技有限公司; Synergy 4 型酶标仪, 美国 BioTek 公司; MCO175 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; AB API4000Qtrap 质谱仪, 美国 AB 公司; Turbo Vap LVX 型氮吹仪, 美国 Caliper 公司; -80 °C 超低温冰箱, 美国 Haier 公司; Multi-Tube Vortexer 型匀浆仪, 中国 TARGIN TECH 公司; universal 320r 型高速离心机, 德国 Hettich 公司; 电子分析天平, 梅特勒-托利多上海仪器有限公司; ULTRA TURRAX T25 basic 型样品分散机, 德国 IKA 公司。

1.4 药物制备 称取红景天苷 80 mg, 溶于 16 mL 生理盐水中, 制备成浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的储备液, 使用时用生理盐水稀释至相应浓度。参照文献中剂量设计^[13], 本实验选用 2.5、5、10 mg·kg⁻¹ 3 个剂量。

1.5 分组 药效实验: 将 50 只实验大鼠随机分为 5 组, 分别为空白组、模型组及红景天苷高、中、低(10、5、2.5 mg·kg⁻¹)剂量组, 每组 10 只。模型组及红景天苷高、中、低剂量组大鼠需进行大脑中动脉栓塞(MCAO)模型复制, 空白组不进行任何造模处理。

药代实验(血浆及脑组织中红景天苷含量检测实验): 将 30 只实验大鼠进行大脑中动脉栓塞模型复制后, 随机分为 3 组, 分别为缺血(即给药)15、40、120 min 组, 每组 10 只, 给药剂量均为红景天苷 15 mg·kg⁻¹。

1.6 大脑中动脉栓塞模型复制与给药 采用线栓法^[12]建立大鼠大脑中动脉栓塞模型。腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉大鼠, 于颈部做正中切口, 分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA), 动脉夹夹闭颈内动脉, 近心端结扎颈总动脉、颈外动脉, 距颈总动脉分叉部 2 mm 处做一“V”形切口, 将栓线插入到颈内动脉, 在颈总动脉远心端轻系栓线。将栓线轻轻前推, 插入深度从颈内与颈外分叉处开始计算, 达 20 mm 时固定线栓, 插入线栓后立即按分组以 2 mL·kg⁻¹ 给药体积进行尾静脉注射给药, 缺血 1.5 h 后拔出线栓, 进行再灌注。空白组与模型组给予等体积的生理盐水。

1.7 大鼠神经行为学评分 缺血 24 h 后对大鼠进行

神经功能评分, 大鼠神经行为学评分参照 Longa 5 分制评分方法^[14]。0 分: 无神经功能缺损。1 分: 左前爪蜷缩, 轻度局灶性神经功能缺损。2 分: 向缺血侧转圈, 中度局灶性神经功能缺损。3 分: 出现翻滚, 严重的局灶性神经功能缺损。4 分: 无自主活动且意识水平低下。剔除评分为 0 分及死亡的大鼠后, 中、低剂量组的大鼠数量为 9 只, 其余组 10 只。

1.8 氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定大鼠脑梗死范围 动物进行神经行为评分后, 称质量, 腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉。随后迅速断头取脑, 置于冰浴台上, 从前往后作冠状位切片, 平均切成 5 个脑片。将大脑切片浸泡于 1.2% TTC 磷酸盐缓冲液中, 37 °C 恒温避光孵育约 10 min。正常脑组织染为玫瑰红色, 脑梗死区不染色(白色)。将脑片浸泡于 10% 福尔马林溶液中固定 4 h。福尔马林固定的脑片按脑的前后顺序整齐排列, 经摄像头采样, 用多媒体彩色病理图文分析系统计算大鼠全脑面积及脑梗死面积, 以梗死面积/全脑面积表示脑梗死范围。

1.9 大鼠血浆中组织因子(TF)表达水平的检测 大鼠麻醉后立即从腹主动脉取血, 置于 3.8% 枸橼酸钠抗凝管中, 静置, 以 4 °C、2 000 × g 离心 15 min 制备血浆。按照试剂盒检测血浆中组织因子表达水平。

1.10 血浆及脑组织中红景天苷的含量检测实验

1.10.1 样本采集 30 只实验动物随机分为 3 组, 每组 10 只。按“1.6”项下方法进行模型复制, 尾静脉注射给药, 给药剂量为 15 mg·kg⁻¹。并于缺血后 15、40、120 min 3 个时间点分别取血, 置于 0.1% 肝素抗凝管中, 以 4 °C、3 000 r·min⁻¹(离心半径 16 cm)离心 15 min 制备血浆。取血后立即从心尖注射 4 °C 生理盐水进行灌注, 并从肝脏做一切口, 直至从肝脏流出清亮的液体。灌注完成后立即取脑, 置于冰上, 冰盐水冲洗外表面后, 用滤纸吸干多余水分, 沿中线迅速切分为左、右脑, 分别置于液氮中速冻, -80 °C 冰箱保存待测, 1 周内处理为待测样本。

1.10.2 样本处理 脑组织样本处理: 取大鼠左、右侧脑组织, 分别置于洁净离心管中, 精密称质量, 按照脑: 水(1:5)的比例加入去离子水, 匀浆。随后取脑组织匀浆 150 μL, 加入含 100 ng·mL⁻¹ 内标的乙腈 300 μL, 涡旋 2 min。接着于 4 °C、10 000 r·min⁻¹(离心半径 8 cm)离心 5 min, 取上清 360 μL, 50 °C 氮气吹干, 以 20% 的甲醇 120 μL 复溶。涡旋混匀, 于 4 °C、10 000 r·min⁻¹(离心半径 8 cm)离心 5 min, 取上清液进样。

血浆样本制备: 吸取 50 μL 血浆, 加入含

500 ng·mL⁻¹ 内标的甲醇 150 μL, 涡旋 2 min。于 4 ℃、10 000 r·min⁻¹(离心半径 8 cm)离心 5 min, 取上清液进样。

1.10.3 溶液的配制 对照品溶液的配制: 精密称定红景天苷对照品、对乙酰氨基酚对照品各 1 mg, 用甲醇稀释成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的储备液备用。

脑组织对照品溶液的配制: 取红景天苷对照品储备液适量, 用脑匀浆液稀释为 0.5g·mL⁻¹ 的母液 I。由母液 I 开始等比稀释, 制备浓度为 0.5、0.25、0.08、0.032、0.012、0.005 g·mL⁻¹ 的一系列对照品溶液, 定量下限(LLOQ)为 0.005 g·mL⁻¹。按照“1.10.2”项下脑组织样本制备法处理。

血浆对照品溶液的配制: 取红景天苷对照品储备液适量与空白血浆混合得浓度为 50 g·mL⁻¹ 母液 II。由母液 II 开始等比稀释, 制备浓度为 50、12.5、3.13、0.785、0.196、0.049、0.012 g·mL⁻¹ 的一系列对照品溶液, 定量下限(LLOQ)为 12.25 g·mL⁻¹。按照“1.10.2”项下血浆样本制备法处理。

内标溶液的配制: 精密称定对乙酰氨基酚对照品 1 mg, 用甲醇稀释成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的储备液备用。脑组织内标溶液: 取适量对乙酰氨基酚储备液, 用乙腈稀释至 100 ng·mL⁻¹ 备用。血浆内标溶液的配制: 取适量对照品储备液, 用甲醇稀释至 500 ng·mL⁻¹ 备用。

1.10.4 检测条件 色谱条件: Agilent luna C₁₈ 色谱柱 (2.0 mm×50 mm)。流动相, A 相为水: 甲醇: 乙腈 (9: 0.5: 0.5, 含 0.01% 甲酸), B 相为甲醇: 乙腈 (1: 1, 含 0.01% 甲酸)。梯度洗脱: 0~0.3 min, 93%~50% A; 0.3~1.0 min, 50% A; 1.0~2.0 min, 50%~93% A; 2.0~5.0 min, 93% A。柱温: 30 ℃。流速: 0.0~1.0 min, 0.4 mL·min⁻¹; 1.0~2.0 min, 0.4~0.6 mL·min⁻¹; 2.0~5.0 min, 0.6 mL·min⁻¹。自动进样器温度 4 ℃, 进样量 10 μL。质谱条件: 离子源为 ESI 离子源; 离子源温度(TEM)550 ℃; GS1 和 GS2 均为氮气, GS1 30 psi, GS2 40 psi; CUR 10 psi; 离子喷雾电压-4 500 V; 碰撞气(CAD) Medium; 扫描方式为多反应检测(MRM), 负离子模式。红景天苷及对乙酰氨基酚的检测离子对见表 1。

表 1 红景天苷与对乙酰氨基酚的保留时间及质谱参数

Table 1 Retention time, related MS parameters of the salidroside and acetaminophen

化合物	<i>t_R</i> /min	离子对 <i>m/z</i>	解簇电压/V	碰撞能量/eV
对乙酰氨基酚	1.30	149.9~106.9	-59.5	-25
红景天苷	1.85	299.0~119.0	-70	-20

1.11 细胞实验

1.11.1 细胞培养 HCMEC 细胞培养于完全培养基中, 培养条件为 37 ℃, 5% CO₂。按照 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 均匀接种于 96 孔板中, 置于培养箱中培养 24 h 后进行后续实验。

1.11.2 红景天苷细胞毒性实验 实验设置对照组及红景天苷不同剂量 (100、50、25、12.5 μmol·mL⁻¹) 组。加入药物处理 24 h 后使用 CCK-8 法检测细胞活力。

1.11.3 模型复制 为模拟体内脑组织缺血缺氧状态, 体外采用氧糖剥夺(OXYGEN GLUCOSE DEPRIVATION, OGD)模型。具体方法为: 弃去原先培养液, 加入预先配制好的红景天苷含药 (100、50、25、12.5 μmol·mL⁻¹) 无糖培养基, 放入缺氧盒中, 通 95 %N₂ 和 5 %CO₂ 混合气 15 min, 流速为 1.5 L·min⁻¹, 夹闭进气管和出气管, 将缺氧盒放入培养箱中培养 6 h。

1.11.4 细胞上清液中 NO 含量检测 取出“1.11.3”项下的培养板, 按照试剂盒方法, 检测细胞上清液中 NO 含量。

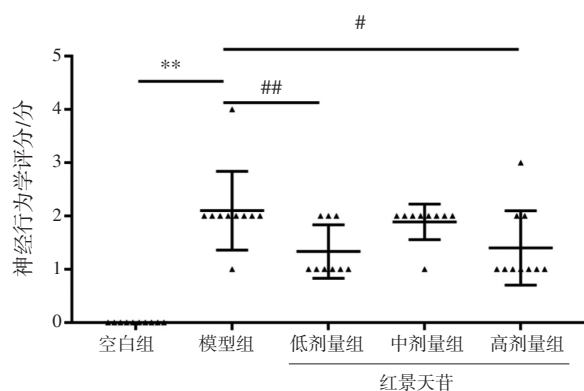
1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 各组数据均服从正态分布 (Shapiro-Wilk 检验), 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析方法, 两两比较若方差齐性则采用 LSD-*t* 法检验, 若方差不齐则采用 Dunnett's T3 法进行检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红景天苷对缺血再灌注大鼠神经行为学评分的影响 与空白组大鼠比较, 缺血 24 h 后, 模型组大鼠出现明显神经功能缺损, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。与模型组比较, 红景天苷低、高剂量组可明显减少缺血导致的神经功能的丢失, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01, *P* < 0.05), 结果见图 1。

2.2 红景天苷对各组大鼠脑梗死面积的影响 见表 2。TTC 染色结果显示, 与空白组比, 模型组大鼠术侧局部缺血严重, 形成明显的梗死灶 (*P* < 0.01)。与模型组比较, 红景天苷高、中、低剂量组大鼠梗死面积均明显减小, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

2.3 红景天苷对血浆中组织因子表达的影响 从神经行为学评分 (图 1) 及脑梗死面积测量结果 (表 2) 看, 红景天苷高、低剂量组效果较好, 所以选择红景天苷高、低剂量两个组进行后续实验验证。如图 2 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠血浆中组织因子表达明显升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。与模型



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图1 红景天苷对大鼠神经功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=9 \sim 10$)

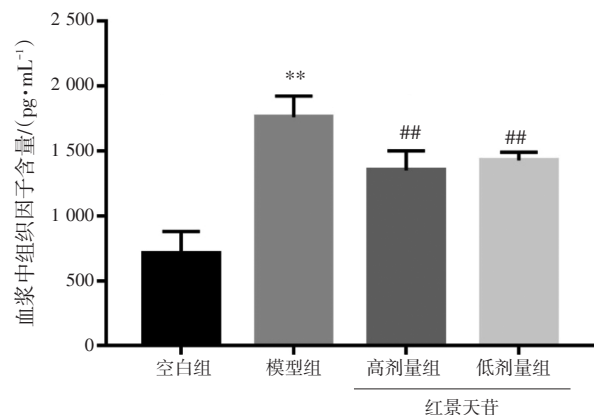
Figure 1 The effect of salidroside on neurological function in rats($\bar{x} \pm s$, $n=9 \sim 10$)

表2 红景天苷对大鼠梗死面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=9 \sim 10$)

Table 2 The effect of salidroside on ischemic area in rats($\bar{x} \pm s$, $n=9 \sim 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	鼠数/只	梗死面积/%
空白组	-	10	0.00 ± 0.00
模型组	-	10	28.49 ± 3.17**
红景天苷高剂量组	10	10	18.58 ± 8.80**
红景天苷中剂量组	5	9	23.77 ± 6.40*
红景天苷低剂量组	2.5	9	20.68 ± 6.81**

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$

图2 各组大鼠血浆中组织因子(TF)表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=9 \sim 10$)

Figure 2 The expression level of tissue factor(TF) in plasma of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=9 \sim 10$)

组比较，红景天苷高、低剂量组组织因子表达均明显降低，差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 标准曲线及定量下限 各样本的标准曲线方程及相关系数由 AB Sciex Multi Quant 1.6 数据处理软件自动得出，结果见表3。由结果可知，大鼠脑组织中，红景天苷的质量浓度在 4.8 ~ 500 ng·mL⁻¹ 线性关

系良好，定量下限为 4.8 ng·mL⁻¹。在大鼠血浆中，红景天苷的质量浓度在 12.25 ~ 50 000 ng·mL⁻¹ 线性关系良好，定量下限为 12.25 ng·mL⁻¹。

表3 红景天苷在大鼠脑组织及血浆中线性方程、线性范围及定量下限

Table 3 Typical equations for calibration curves, linear ranges, and LLOQ of salidroside in plasma and brain tissue of rats

待测物	标准曲线	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	定量下限/(ng·mL ⁻¹)
脑组织	$y=0.949x+2.33e-009$	0.994 4	4.8~500	4.8
血浆	$y=0.112x+0.002\ 14$	0.998 3	12.25~50 000	12.25

2.5 红景天苷在缺血再灌注大鼠血浆及脑组织内的分布

表4显示，在给药 15 min 后，大鼠血浆及脑组织中红景天苷含量均较高；到给药 120 min 时，脑组织及血浆中红景天苷含量均较低。与给药 15 min 组比较，40 min 组脑组织($P > 0.05$)及血浆($P < 0.01$)中红景天苷含量降低，其中两组脑组织的差异无统计学意义；120 min 组脑组织及血浆中红景天苷含量均明显降低，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与 40 min 组比较，120 min 组的脑组织及血浆中红景天苷含量均明显降低，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。说明红景天苷在体内代谢清除速率较快。而在同一时间点，左、右脑组织中红景天苷含量的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表4 大鼠脑组织及血浆中红景天苷的含量($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

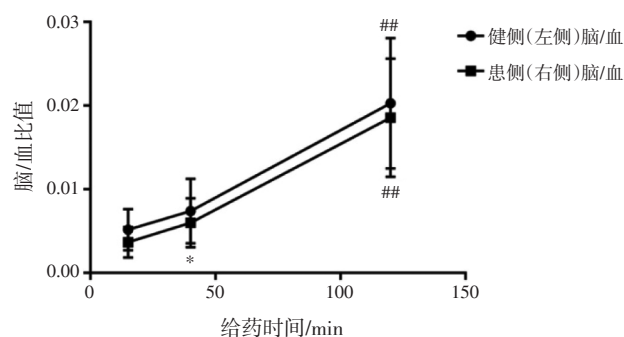
Table 4 The concentration of salidroside in plasma and brain tissue of rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组织	红景天苷的含量/(μg·mL ⁻¹)		
	给药 15 min	给药 40 min	给药 120 min
左脑	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.007 ± 0.002****
右脑	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.005 ± 0.002****
血浆	7.84 ± 1.47	3.17 ± 0.86**	0.380 ± 0.170****

注：与给药 15 min 组比较，** $P < 0.01$ ；与给药 40 min 组比较，** $P < 0.01$

图3显示，与给药 15 min 组比较，红景天苷在给药 40 min 组大鼠患侧(即右侧)的脑/血比值(脑/血=脑组织含量/血浆含量)明显升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)；健侧(即左侧)的脑/血比值呈升高趋势，差异无统计学意义($P > 0.05$)。与给药 40 min 组比较，给药 120 min 组大鼠健侧(即左侧)与患侧(即右侧)的脑/血比值均明显升高，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 红景天苷对内皮细胞细胞活力的影响 如图4所示，各剂量红景天苷对内皮细胞活力没有明显影



注: 与给药 15 min 组比较, * $P < 0.05$; 与给药 40 min 组比较, ** $P < 0.01$

图 3 各时间点脑/血比值图($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 3 The brain-blood ratio at each time point($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

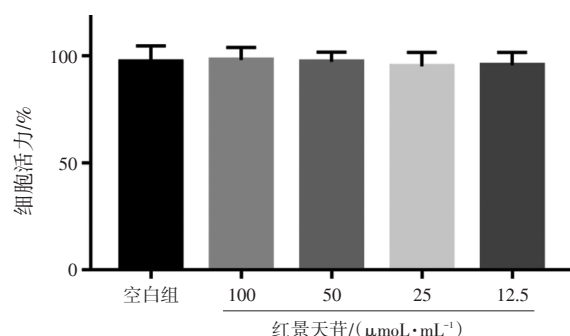


图 4 红景天苷对内皮细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 4 The effect of salidroside on endothelial cell viability($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

响, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 所以选择 100、50、25、12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 继续进行后续细胞药效实验。

2.7 红景天苷对氧糖剥夺后内皮细胞 NO 释放的作用 与空白组比较, 模型组内皮细胞 NO 的释放明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 红景天苷各剂量组内皮细胞 NO 的释放均明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 结果见图 5。

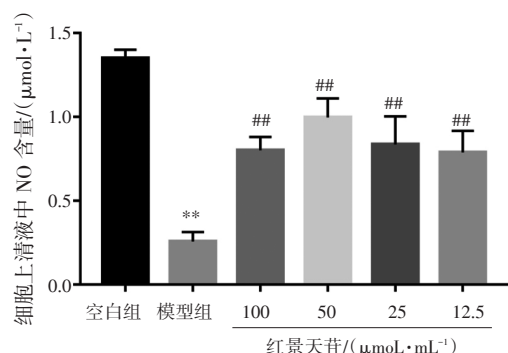


图 5 红景天苷对氧糖剥夺(OGD)后的内皮细胞的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 5 The effect of salidroside on the OGD induced injury of HCMEC($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

本研究结果显示, 模型组大鼠出现明显的神经功能障碍及梗死灶, 表明本实验大鼠脑缺血再灌注模型建立成功。与其他学者研究^[15-17]结果一致, 在药效实验中, 红景天苷各剂量组均能明显减少脑梗死面积, 减少神经行为缺损, 表明红景天苷对缺血性中风具有明显的治疗作用。

程琼等的研究^[18]结果表明, 大鼠 300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 股静脉注射红景天苷后, 脑组织中含量较低, 且在给药 15 min 后脑中未能检出红景天苷。考虑到缺血会导致内皮细胞受损, 红景天苷可能透过受损的内皮细胞进入脑实质。本实验选择 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行血/脑药物含量对比研究, 观察缺血后 15、40、120 min 3 个时间点脑组织及血浆中红景天苷含量。结果缺血 15 min 后血浆中红景天苷含量即达到峰值, 随时间呈明显下降趋势。无论是血浆还是脑组织中, 120 min 时红景天苷含量都较低, 表明红景天苷在体内代谢清除速率较快。

脑/血比值是衡量药物能否入脑的金指标^[19]。本实验中其随时间增加虽呈明显增加趋势, 但各时间点的整脑/血比值均小于 0.1, 且各时间点左、右脑组织中红景天苷含量无明显差异, 表明在缺血急性期红景天苷透过血脑屏障进入脑组织的量非常有限。

结合药效及含量检测两部分实验结果来看, 红景天苷虽然无法透过脑屏障进入脑实质, 但是对缺血性中风具有明确的治疗作用, 所以我们推测红景天苷可能不是在脑实质内发挥神经保护作用, 而可能在血液侧起效。有研究^[20]指出, 血液源性的组织因子会导致血栓形成。本实验 ELISA 结果表明缺血再灌注大鼠血浆中组织因子含量明显升高。红景天苷可明显降低缺血再灌注后组织因子含量, 表明红景天苷可抑制缺血再灌注后的血栓形成。同时, 体外研究结果证实, 氧糖剥夺后内皮细胞 NO 释放明显降低, 内皮功能受到破坏, 而红景天苷的干预可以逆转 NO 释放的降低, 表明红景天苷对氧糖剥夺造成的内皮损伤也具有明显的保护作用。因此综合体内外实验结果来看, 一方面, 红景天苷可降低缺血之后组织因子的表达, 改善缺血之后的血瘀状态; 另一方面, 红景天苷可能在血液侧保护内皮细胞, 从而发挥脑保护作用。

红景天苷治疗缺血性中风的机制研究^[21-24]证明, 其神经保护作用机制主要涉及抗炎、抗氧化、抑制神经元凋亡等。目前未见对红景天苷的起效部位进行阐述, 且在缺血再灌注模型动物上的药代动力学研究也未见报道。本研究通过 LC-MS 检测红景天苷

在缺血再灌注大鼠脑组织及血浆中含量,再结合体内药效实验,证实红景天苷可能在血液侧发挥脑保护作用。

本实验含量检测部分仅检测了红景天苷在脑组织及血浆中的含量,未检测红景天苷代谢物的含量。虽然红景天苷水溶性强,但其代谢物(如酪醇)具有亲脂性,可能透过内皮细胞进入脑实质发挥作用。所以,红景天苷对缺血性中风具有较好的治疗作用,原因一部分在于其在血液侧的作用,还有一部分可能在于红景天苷代谢物可能在脑实质发挥作用,但这部分猜想仍需进一步的实验验证。

综上,本次研究通过体内外药效实验及红景天苷组织含量检测,证明红景天苷在缺血再灌注模型大鼠中主要在血液侧发挥脑保护作用,为其进一步的药效及机制作用探讨提供了参考。但红景天苷在缺血再灌注模型动物体内药代动力学的过程仍需要进一步深入研究,尤其需要关注红景天苷的代谢物及其在脑组织中的分布。

参考文献:

- [1] 吴秀专, 毕晓华, 王燕芳, 等. 红景天苷药理作用研究进展概述[J]. 长沙医学院学报, 2019, 17(4): 29-33.
- [2] YAN T H, DU B S, YANG W, et al. Effects of salidroside on hemorheology and myocardial ischemic reperfusion injury in isolated heart of rats[J]. Chinese journal of natural Medicines, 2008, 6(3): 219-222.
- [3] 林晓坚, 袁兆伟, 潘彩燕, 等. 红景天苷对小鼠抗血小板活性和抗血栓作用[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44(9): 1039-1043, 1048.
- [4] 张庆光, 马丽娟, 朱亮, 等. 红景天苷防治缺血再灌注损伤的药理作用及相关机制研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(1): 126-133.
- [5] 刘永. 红景天苷口服给药后药代动力学及在体肠吸收特性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- [6] ZHANG F, GONG X, XIAO B, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of a bioactive sesquiterpenoid from polygonum jucundum following oral and intravenous administrations to rats[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 83(16): 135-140.
- [7] JEFFREY P, SUMMERFIELD S G. Challenges for blood-brain barrier (BBB) screening[J]. Xenobiotica, 2007, 37(10-11): 1135-1151.
- [8] LINVILLE R M, DESTEFANO J G, SKLAR M B, et al. Human iPSC-derived blood-brain barrier microvessels: validation of barrier function and endothelial cell behavior[J]. Biomaterials, 2019, 190-191: 24-37.
- [9] BOCHENEK M L, SCHÄFER K. Role of endothelial cells in acute and chronic thrombosis[J]. Hamostaseologie, 2019, 39(2): 128-139.
- [10] CHEN Z Q, MOU R T, FENG D X, et al. The role of nitric oxide in stroke[J]. Medical gas research, 2017, 7(3): 194-203.
- [11] YANG Y, ZHANG M K, KANG X N, et al. Thrombin-induced microglial activation impairs hippocampal neurogenesis and spatial memory ability in mice[J]. Behav Brain Funct, 2015, 11(1): 30.
- [12] 宋文婷, 刘建勋, 姚明江, 等. 银杏蜜环口服溶液减轻脑缺血再灌注大鼠脑梗死的实验研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(1): 36-40.
- [13] 王景叶, 于榕, 姚明辉. 红景天苷对缺血再灌注大鼠脑组织损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 456-459.
- [14] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [15] DONG C, WEN S, ZHAO S, et al. Salidroside inhibits reactive astrogliosis and glial scar formation in late cerebral ischemia via the Akt/GSK-3 β pathway[J]. Neurochemical research, 2021, 46(4): 755-769.
- [16] WEI Y C, HONG H M, ZHANG X Q, et al. Salidroside inhibits inflammation through PI3K/Akt/HIF signaling after focal cerebral ischemia in rats[J]. Inflammation, 2017, 40(4): 1297-1309.
- [17] 李剑, 李清宇, 闫志强. 红景天苷对缺氧缺血性脑损伤大鼠血脑屏障的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(5): 510-514.
- [18] 程琼, 张书强, 丁斐. 大鼠体内红景天苷浓度的测定及药代动力学研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2422-2424.
- [19] KULKARNI A D, PATEL H M, SURANA S J, et al. Brain-blood ratio: implications in brain drug delivery[J]. Expert opinion on drug delivery, 2016, 13(1): 85-92.
- [20] HOFFMAN M, WHINNA H C, MONROE D M. Circulating tissue factor accumulates in thrombi, but not in hemostatic plugs[J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(9): 2092-2093.
- [21] 魏艺聪, 洪海棉, 应雄, 等. 红景天苷对脑缺血再灌注大鼠炎症细胞因子表达的影响[J]. 福建中医药, 2016, 47(6): 46-48.
- [22] ZUO W, YAN F, ZHANG B, et al. Salidroside improves brain ischemic injury by activating PI3K/Akt pathway and reduces complications induced by delayed tPA treatment[J]. European journal of pharmacology, 2018, 830: 128-138.
- [23] ZHANG X, DU Q M, YANG Y, et al. Salidroside alleviates ischemic brain injury in mice with ischemic stroke through regulating BDNF mediated PI3K/Akt pathway[J]. Biochemical pharmacology, 2018, 156: 99-108.
- [24] LINVILLE R M, DESTEFANO J G, SKLAR M B, et al. Human iPSC-derived blood-brain barrier microvessels: validation of barrier function and endothelial cell behavior[J]. Biomaterials, 2019, 190-191: 24-37.

(编辑: 修春)