

疏血通脉胶囊对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经保护作用研究[△]

陈朝^{1*}, 刘泰¹, 黄一挚², 黄敏¹, 甘典辉¹, 龚敏阳^{1#}, 黎红丹¹(1.广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2.广西卫生职业技术学院, 南宁 530021)

中图分类号 R743;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)16-2184-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.16.06

摘要 目的:研究疏血通脉胶囊对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经保护作用。方法:将36只SD大鼠随机分为假手术组(等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)、尼莫地平组(0.01 g/kg)和疏血通脉胶囊低、中、高剂量组(0.32、0.64、1.28 g/kg),每组6只。除假手术组外,其余5组大鼠均以线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型,造模成功后灌胃相应药物,每天1次,连续28 d。于给药前及给药后3、7、14、28 d采用改良神经功能评分法进行大鼠神经功能缺损评分;给药后28 d以三磷酸脱氧鸟苷-生物素刻痕末端标记(TUNEL)法检测大鼠脑组织皮质区神经细胞凋亡情况,以免疫组化法检测大鼠脑组织皮质区脑源性神经营养因子(BDNF)表达情况。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高,脑组织皮质区凋亡神经细胞数显著增加,BDNF表达显著增强,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组和疏血通脉胶囊低、中、高剂量组大鼠给药后7、14、28 d神经功能缺损评分均显著降低;给药后28 d脑组织皮质区凋亡神经细胞数显著减少,BDNF表达显著增强,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论:疏血通脉胶囊对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经功能有一定保护作用,其机制可能与增强BDNF表达,抑制神经细胞凋亡有关。

关键词 疏血通脉胶囊;脑缺血再灌注;脑源性神经营养因子;细胞凋亡

Study on Neuroprotective Effect of Shuxue Tongmai Capsules on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

CHEN Chao¹, LIU Tai¹, HUANG Yizhi², HUANG Min¹, GAN Dianhui¹, GONG Minyang¹, LI Hongdan¹ (1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Health Technical Vocational College, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the neuroprotective effect of Shuxue tongmai (SXTM) capsules on cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. METHODS: A total of 36 SD rats were randomly divided into sham operation group (equal volume 0.9% sodium chloride solution), model group (equal volume 0.9% sodium chloride solution), nimodipine group (0.01 g/kg), SXTM capsules low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.32, 0.64, 1.28 g/kg), with 6 rats in each group. Except for sham operation group, cerebral ischemia reperfusion injury model of rats was established in other 5 groups, and relevant medicine was given intragastrically after modeling, once 2 day, for consecutive 28 d. Neurological function deficit scores were by mNSS method obtained before medication and 3, 7, 14, and 28 d after medication. The cortical neuron apoptosis in cortex area of rats' brain tissue was determined by TUNEL method 28 d after medication. The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebral tissue was determined by immunohistochemical staining method. RESULTS: Compared with sham operation group, the neurological function deficit score of model group was increased significantly 7, 14, 28 d after medication. The number of apoptotic cell was increased significantly 28 d after medication, and the expression of BDNF was strengthened significantly, there were significant difference ($P<0.01$). Compared with model group, neurological function scores of nimodipine group and SXTM capsules low-dose, medium-dose and high-dose groups were decreased significantly ($P<0.01$). The number of apoptotic cell was decreased significantly 28 d after medication ($P<0.01$), and the expression of BDNF was strengthened significantly, there were significant difference ($P<0.01$). CONCLUSIONS: SXTM capsules has a neuroprotective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury model rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting neuronal apoptosis and strengthening the expression of BDNF.

KEYWORDS Shuxue tongmai capsules; Cerebral ischemia-reperfusion; Brain-derived neurotrophic factor; Cell apoptosis

[△] 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2014GXNSF-BA118168);全国中药特色技术传承人才培训项目(No.国中医药人教函[2014]181号);广西卫生厅中医药医院制剂类课题(No.GZYZ-10-04)

* 副主任药师,硕士。研究方向:医院药学与中药制剂。电话:0771-5645433。E-mail:chaochen1980@163.com

通信作者:副主任药师。研究方向:中药制剂研发。电话:0771-5645433。E-mail:gongminyang@163.com

缺血性脑中风是因大脑血液供应受到干扰所造成的脑功能迅速丧失的一种疾病,是造成人类严重残疾和死亡的重要原因之一。脑缺血再灌注的危害极大,其间会产生大量的活性氧和自由基,从而启动一系列机制导致脑细胞凋亡和坏死^[1-2]。疏血通脉胶囊是基于广西名中医刘泰教授经验中药方剂经现代工艺流程所制得的

胶囊制剂(专利号:2013104694924)^[3-4],该药由三七、薤白、地龙、瓜蒌皮、冰片等药材组合而成,具有化痰熄风、祛瘀通络、痰瘀同治之功,主要用于缺血性脑中风的治疗。前期实验发现,该药可防治血栓的形成及发展,减轻缺血区的炎症反应,改善脑循环,减少神经细胞凋亡^[5-6]。但其对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用机制尚不明确。

脑源性神经营养因子(BDNF)作为神经营养因子家族中的一员,由脑组织合成,并广泛分布于中枢神经系统,为感觉神经元、运动神经元及多巴胺神经元提供强大的营养支持,在神经细胞修复和结构重建过程中起重要作用^[7-8]。

本研究拟给予大鼠脑中动脉闭塞所致的脑缺血再灌注损伤模型大鼠疏血通脉胶囊进行干预,观察其对模型大鼠神经功能的保护作用,及对模型大鼠脑组织皮质区神经细胞凋亡和BDNF表达的影响,以期进一步揭示其作用机制,为临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 仪器

IX53型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);EG1150H型生物组织包埋机、ASP200S型组织脱水机、RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司);Image-Pro Plus V6.0图像分析软件(美国Media Cybernetics公司)。

1.2 药品与试剂

疏血通脉胶囊(广西中医药大学第一附属医院制剂室自制,批号:20160304,规格:0.5 g/粒);尼莫地平片(亚宝药业集团股份有限公司,批准文号:国药准字H40000119,批号:1411048,规格:20 mg/片);兔抗大鼠BDNF抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA20140601);链霉亲和素-生物素复合物(SABC)试剂盒(批号:16151A06,包括二抗、辣根酶标记链酶卵白素工作液)、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(批号:K1552317E)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;转移酶介导的三磷酸脱氧鸟苷-生物素刻痕末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(河北博海生物开发工程有限公司,批号:161705);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

清洁级健康SD大鼠36只,雄性,体质量250~280 g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(桂)2014-0002。标准条件饲养,自由进食、饮水,适宜温度、湿度,人工黑暗和光照交替。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将36只SD大鼠随机分为假手术组(等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)、尼莫地平组(0.01 g/kg)和疏血通脉胶囊低、中、高剂量组(0.32、0.64、1.28 g/kg),每组6只。给药依据:尼莫地平片成人每日剂量为0.1 g/60 kg,根据大鼠药物剂量换算关系表^[9],

计算得大鼠的等效剂量为0.01 g/kg;疏血通脉胶囊成人每日剂量为3 g,依上述方法计算得大鼠的等效剂量为0.32 g/kg,疏血通脉胶囊低、中、高剂量组分别为成人等效剂量的1、2、4倍。除假手术组外,其余5组大鼠均以线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型^[10](造模前禁食12 h,不禁水):大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,固定后,取颈部正中切口,钝性分离皮下组织,暴露右侧颈总动脉,分离颈总、颈内、颈外动脉,结扎颈总、颈外动脉。用眼科剪将颈总动脉近分叉处剪一“V”字形切口,将线栓经颈外动脉插入颈内动脉,直到感觉有阻力时停止进线,并将其稍退出1~2 mm,线栓即到达大脑中动脉起始部,进线深度为(18.0±0.5)mm,此时开始记录缺血时间,固定线栓,缝合伤口并消毒。缺血1.5 h后进行再灌注,将线栓拔出,恢复大脑中动脉血供。手术过程中予以照射灯保持大鼠体温在(37.0±0.5)℃,并监测肛温、呼吸和心率。假手术组大鼠线栓插入颈总动脉深度为0.5 mm,其余手术操作相同。以大鼠苏醒后爬行时向左转圈(追尾现象),严重时向左跌倒,提尾时左前肢内收屈曲为造模成功标志。各组大鼠苏醒后开始灌胃相应药物,每天1次,连续28 d。

2.2 神经功能缺损评分

在给药前及给药后3、7、14、28 d,采用改良神经功能评分法(mNSS)对大鼠神经功能缺损进行测评^[11]。mNSS评分分为运动、感觉、平衡和反射4个部分,总分为18分,正常大鼠评分为0分;评分越低表示神经功能缺损程度越轻(详见表1)。

表1 大鼠神经功能缺损评分标准

Tab 1 Rat Modified Neurological Severity Score standard

项目	分项	分值	
运动实验(正常分值=0;最高分值=6)	提尾实验(患侧无法完成以下动作时)		
	前肢收缩	1	
	后肢收缩	1	
	30 s内头部运动并偏离垂直线>100°	1	
	将大鼠置于地板上		
	正常行走	0	
	不能直行	1	
	向对侧绕圈	2	
	向对侧摔倒	3	
	感觉实验(正常分值=0;最高分值=2)	推动大鼠向侧方移动,大鼠无法移动	1
将大鼠患肢置于桌子边缘,大鼠无肢体收缩反应		1	
平衡实验(正常分值=0;最高分值=6)		平衡	0
		紧抓平衡木边缘	1
		抱住平衡木,1肢体跌落	2
		抱住平衡木,2肢体跌落;或抱位平衡木旋转>600°	3
	试图平衡,但失败跌落(>40 s)	4	
	试图平衡,但失败跌落(>20 s)	5	
反射实验(正常值=0;最大值=4)	跌落(<20 s)	6	
	耳廓反射(刺激外耳道时摇头)缺失	1	
	角膜反射(棉丝刺激角膜时眨眼)缺失	1	
	惊吓反射(弹响纸板产生短暂性噪音引起的运动反应)缺失	1	
	抽搐、肌痉挛、肌张力障碍	1	
	总分		18

2.3 神经细胞凋亡检测

采用TUNEL法检测大鼠脑组织皮质区神经细胞凋

亡情况。给药后 28 d,大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg),依次经心脏灌注 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 和 4% 多聚甲醛溶液 250 mL,断头取脑,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h,蒸馏水浸泡 4 h,然后以常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,自视交叉后方开始连续冠状位切片,厚度 5 μ m,贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,得石蜡切片,室温保存。石蜡切片经常规脱蜡水化、蛋白酶 K 室温孵育 15 min 后,磷酸盐缓冲液(PBS, pH=6.8)漂洗 2 次(每次 5 min),滴加标记液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, PBS 漂洗 3 次(每次 2 min),加入过氧化物酶 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次(每次 2 min), DAB 显色,苏木精轻度复染细胞核,脱水、透明、封固,于倒置相差显微镜下观察,细胞核呈棕黄色颗粒者为凋亡阳性细胞^[12-13]。每只大鼠取 4 张切片,于每张切片脑梗死侧皮质区随机选定 4 个不重叠视野($\times 200$)进行凋亡神经细胞计数。

2.4 BDNF 表达检测

采用免疫组化法检测脑组织大脑皮质区 BDNF 表达。取“2.3”项下石蜡切片常规脱蜡、水化、微波热修复,以 3% 过氧化氢室温孵育 5~10 min(以消除内源性过氧化氢酶的活性),PBS 漂洗 3 次(每次 5 min),滴加正常山羊血清封闭液室温孵育 30 min 后倾去上清,滴加稀释后的一抗兔抗大鼠 BDNF 抗体[工作浓度约为 1:50(V/V)],4 $^{\circ}$ C 过夜,经冷 PBS 漂洗 2 次(每次 5 min)后滴加生物素标记的二抗,室温孵育 20 min 后滴加辣根过氧化物酶标记的白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次(每次 5 min),DAB 显色,苏木精复染细胞核,脱水、透明、封固,于倒置相差显微镜下观察,细胞浆或细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。每只大鼠取 4 张切片,于每张切片脑梗死侧皮质区随机选定 4 个不重叠视野($\times 400$)进行阳性细胞计数。以表达呈阳性的细胞数代表 BDNF 表达情况。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

假手术组大鼠在给药前及给药后 3、7、14、28 d 的神经功能缺损评分均为 0 分。与假手术组同期比较,模型组大鼠神经功能缺损评分均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组同期比较,给药后 7、14、28 d 尼莫地平组和疏血通胶囊低、中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。各组大鼠神经功能缺损评分比较见表 2。

3.2 各组大鼠脑组织皮质区神经细胞凋亡情况比较

假手术组大鼠脑组织皮质区可见少量凋亡神经细胞。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织皮质区凋亡神经细胞数显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,给药后 28 d 尼莫地平组和疏血通胶囊低、

中、高剂量组大鼠脑组织皮质区凋亡神经细胞数显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。各组大鼠脑组织皮质区神经细胞凋亡情况显微图见图 1,凋亡神经细胞数比较见表 3。

表 2 各组大鼠神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Comparison of neurological function scores of rats among those groups($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药前	给药后 3 d	给药后 7 d	给药后 14 d	给药后 28 d
假手术组	0	0	0	0	0
模型组	11.50 \pm 0.84*	10.33 \pm 1.21*	8.67 \pm 1.21*	7.33 \pm 0.82*	5.84 \pm 1.17*
尼莫地平组	11.33 \pm 0.82	10.33 \pm 0.82	7.50 \pm 1.05*	5.67 \pm 1.37*	4.17 \pm 0.98*
疏血通胶囊低剂量组	11.17 \pm 0.75	10.17 \pm 1.17	7.67 \pm 1.03*	6.16 \pm 1.60*	4.50 \pm 1.52*
疏血通胶囊中剂量组	11.33 \pm 1.21	10.16 \pm 1.48	7.17 \pm 0.75*	5.83 \pm 1.16*	4.00 \pm 1.26*
疏血通胶囊高剂量组	11.17 \pm 0.55	10.00 \pm 1.67	6.83 \pm 0.75*	5.33 \pm 0.52*	3.50 \pm 1.05*

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group,* $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.01$

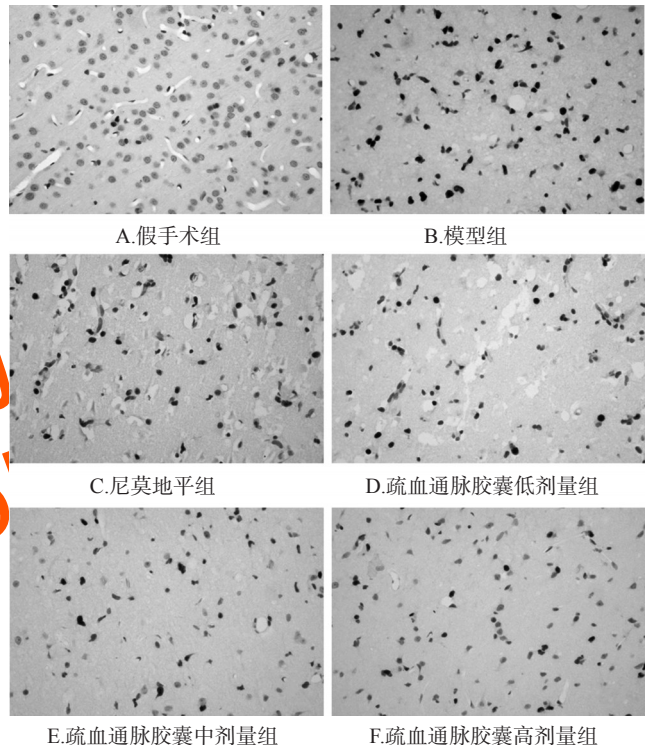


图 1 各组大鼠脑组织皮质区神经细胞凋亡情况显微图(TUNEL 染色, $\times 200$)

Fig 1 Micrographs of cortical neuron apoptosis in rats (TUNEL staining, $\times 200$)

表 3 各组大鼠脑组织皮质区凋亡神经细胞数和 BDNF 表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Comparison of the number of neuron apoptotic cell and BDNF expression in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	凋亡神经细胞数	BDNF 表达
假手术组	7.17 \pm 1.33	5.83 \pm 1.17
模型组	72.16 \pm 3.76*	11.17 \pm 1.16*
尼莫地平组	65.17 \pm 3.06*	13.33 \pm 1.63*
疏血通胶囊低剂量组	64.50 \pm 3.33*	13.67 \pm 2.06*
疏血通胶囊中剂量组	61.50 \pm 2.88*	14.50 \pm 2.17*
疏血通胶囊高剂量组	60.17 \pm 3.06*	15.50 \pm 1.87*

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group,* $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.01$

3.3 各组大鼠脑组织皮质区BDNF表达比较

假手术组大鼠脑组织皮质区可见BDNF微弱表达的阳性细胞。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织皮质区BDNF表达显著增强,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,给药后28 d尼莫地平组和疏血通胶囊低、中、高剂量组大鼠脑组织皮质区BDNF表达显著增强,差异均有统计学意义($P<0.01$)。各组大鼠脑组织皮质区BDNF表达见图2,BDNF表达阳性细胞数比较见表3。

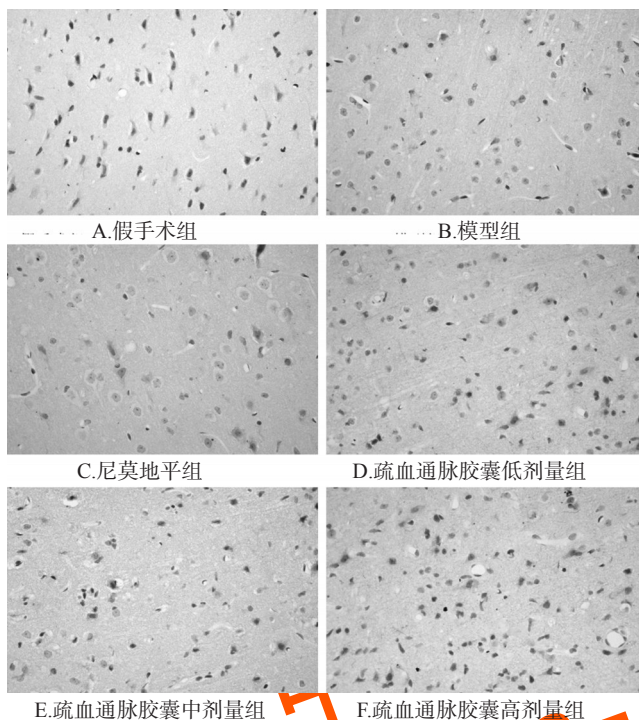


图2 各组大鼠脑组织皮质区BDNF表达情况显微图(免疫组化染色,×400)

Fig 2 Micrographs of BDNF expression in cortex of rats in each group (immunohistochemical staining, ×400)

4 讨论

缺血缺氧性脑损伤的直接后果是神经细胞凋亡或不可逆性坏死和超微结构损坏^[12]。因此,改善神经细胞的生存环境,抑制缺血缺氧神经细胞的凋亡或坏死,促进原有神经细胞的功能恢复以及诱导分化形成新的神经细胞,可能成为缺血缺氧性脑损伤治疗的重要途径^[13]。BDNF是神经生长因子家族成员之一,是在脑内合成的一种蛋白质,广泛存在于中枢神经系统的各个部位,以大脑皮质、海马及纹状体分布最为丰富。BDNF通过与酪氨酸激酶受体的结合激活细胞内信号转导途径,促进中枢神经系统发育过程中特定神经细胞的表达、分化、生长发育及突触可塑性的调节,抑制神经细胞凋亡,改善神经细胞的病理状态,发挥神经保护作用^[14-15]。BDNF表达高的区域病理改变轻,有利于损伤神经细胞的修复。造模

后大鼠大脑呈缺血的病理状态,脑组织皮质区BDNF与其受体的结合信号转导途径被激活,BDNF表达增强,因此高于假手术组大鼠脑组织皮质区BDNF的表达。

疏血通胶囊由三七、薤白、地龙、瓜蒌皮、冰片组成,方中三七、薤白为君药,具有化痰、祛瘀、通络之功效;地龙、瓜蒌皮为臣药,协同君药加强活血祛瘀作用;冰片为佐使药,具有开窍醒神、清热止痛之功效。全方共奏化痰熄风、祛瘀通络、痰瘀同治、疏血通脉之功效。研究发现,三七重要活性成分三七皂苷可在一定程度上改善模型大鼠脑缺血再灌注损伤状态^[16],机制可能与其能明显上调模型大鼠大脑皮质区中BDNF蛋白表达有关^[17]。本研究结果显示,脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织皮质区凋亡神经细胞数显著增加,表现为神经功能障碍。经疏血通胶囊干预后,BDNF表达较给药前增强,凋亡细胞数显著减少,大鼠神经功能改善。

综上所述,疏血通胶囊能促进脑缺血再灌注后受损神经的修复,改善模型大鼠的神经行为功能。其机制可能与增强BDNF表达,抑制神经细胞凋亡有关。但其具体机制尚有待更进一步的研究阐明。

参考文献

- [1] 刘洁,董志,廖杨梅,等.淫羊藿苷对中动脉阻塞大鼠脑源性神经营养因子及酪氨酸激酶受体B表达的影响[J]. 中药药理与临床,2015,31(4):34-37.
- [2] 刘泰,韦必清,韦玉进.醒脑通脉胶囊对脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的影响[J]. 辽宁中医杂志,2005,32(2):89-91.
- [3] 刘泰,张志伟.疏血通胶囊中医理论探源[J]. 时珍国医国药,2012,23(9):2295-2297.
- [4] 陈金月,刘泰,周芳,等.疏血通胶囊制备工艺初选及药效学比较[J]. 中国药业,2013,22(23):7-8.
- [5] 莫小林,陈金月,周芳,等.疏血通胶囊对小鼠肠系膜微循环的影响[J]. 甘肃中医学院学报,2012,29(3):4-6.
- [6] 刘泰,周军,段志刚,等.疏血通胶囊对颈总动脉血栓大鼠血浆纤维蛋白降解产物及D-二聚体的影响[J]. 中医杂志,2015,55(1):61-63.
- [7] CRIGLER L, ROBEY RC, ASAWACHAICHARN A, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis[J]. *Exp Neurol*, 2006,198(1):54-64.
- [8] 钟慧霖,陈文明,李翠莹,等.移植BDNF和GDNF基因修饰的hMSCs对大鼠大脑中动脉阻塞的影响[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(1):102-109.
- [9] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005:203.
- [10] LONGA EZ, WEINSLEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy

右兰索拉唑缓释胶囊在Beagle犬体内的生物等效性研究^Δ

喻明洁*,戴青,向荣凤,熊丽蓉,陈勇川*(陆军军医大学第一附属医院药剂科,重庆 400038)

中图分类号 R917;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)16-2188-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.16.07

摘要 目的:建立测定Beagle犬血浆中右兰索拉唑浓度的方法,评价两种右兰索拉唑缓释胶囊的生物等效性。方法:6只Beagle犬随机分为参比制剂组和受试制剂组,每组3只,采用双周期交叉随机试验(清洗期为1周)设计,分别空腹单次口服右兰索拉唑缓释胶囊参比制剂和受试制剂各60 mg,并于给药前及给药后0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、10、12 h自前肢头静脉取血2 mL,采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定Beagle犬血浆中右兰索拉唑的浓度。以奥美拉唑为内标,色谱柱为Inertsil ODS,流动相为甲醇-0.1%甲酸溶液(90:10, V/V);采用电喷雾离子源,以多反应监测模式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为 m/z 369.9→251.7(右兰索拉唑)、 m/z 345.7→197.9(内标)。采用DAS 3.1.6软件计算药动学参数,以双侧 t 检验及 $(1-2\alpha)\%$ 置信区间(CI)法、Wilcoxon检验考察两种制剂的生物等效性。结果:右兰索拉唑血药浓度的线性范围为10~4 000 ng/mL,定量下限为10 ng/mL;批内、批间RSD<10%,准确度为94.40%~105.20%。空腹单次口服参比制剂或受试制剂的 AUC_{0-12} 分别为(8 892.48±1 399.67)、(8 683.71±1 167.88)ng·h/mL, $AUC_{0-\infty}$ 分别为(8 925.73±1 399.64)、(9 053.08±1 553.46)ng·h/mL, t_{max} 分别为(3.50±0.71)、(3.75±1.21)h, c_{max} 分别为(2 980.00±487.40)、(2 863.33±331.34)ng/mL。受试制剂 AUC_{0-12} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 c_{max} 的90%CI均在参比制剂相应参数的80%~125%范围内,两制剂 t_{max} 间的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:本研究建立的LC-MS/MS法适用于Beagle犬血浆中右兰索拉唑浓度的测定,且两种制剂在Beagle犬体内具有生物等效性。

关键词 右兰索拉唑;缓释胶囊;液相色谱-串联质谱法;药动学;生物等效性

Bioequivalence Study of Dexlansoprazole Sustained-release Capsules in Beagle Dogs

YU Mingjie, DAI Qing, XIANG Rongfeng, XIONG Lirong, CHEN Yongchuan (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of dexlansoprazole concentration in plasma of Beagle dogs, and to evaluate bioequivalence of 2 kinds of Dexlansoprazole sustained-release capsules. **METHODS:** A total of 6 Beagle dogs were randomly divided into reference preparation group and test preparation group, with 3 dogs in each group. In double cycle cross randomized trial (cleaning period lasting for one week) design, they were given reference preparation and test preparation of Dexlansoprazole sustained-release capsules 60 mg once. The blood sample 2 mL of forelimb vein were collected before medication, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 10, 12 h after medication, respectively. The concentration of dexlansoprazole in plasma of Beagle dogs was determined by LC-MS/MS. Using omeprazole as internal standard, the determination was performed on Inertsil ODS with mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid solution (90:10, V/V). ESI was used for positive ion scanning by multiple reaction monitoring mode. The ion pair for quantitative analysis were m/z 369.9→251.7 (dexlansoprazole) and

tomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.

- [11] LI Y, CHEN J, CHEN XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery[J]. *Neurology*, 2002, 59(4):514-523.
- [12] 欧阳福连,周细中,方素珍,等. 新生大鼠缺血缺氧性脑损伤远期行为学和超微结构改变[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(5):380-384.
- [13] 孙丽,王岭,李艳,等. 黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和机制研究[J]. *中国临床神经科学*, 2014, 22(1):43-49.

- [14] KIM DH, ZHAO X, TU CH, et al. Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor[J]. *J Neurosurg*, 2004, 100(1):79-87.
- [15] TAKEMURA Y, IMAI S, KOJIMA H, et al. Brain-derived neurotrophic factor from bone marrow-derived cells promotes post-injury repair of peripheral nerve[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):445-492.
- [16] 方道硕,彭明勇. 三七总皂苷联合牛磺酸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用[J]. *中国药房*, 2013, 24(47):4436-4438.
- [17] 吴兰鸥,詹合琴,闫俊岭,等. 三七皂苷Rg₁对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨[J]. *中草药*, 2006, 37(2):229-233.

^Δ 基金项目:重庆市科学技术委员会社会事业与民生保障科技创新专项(No.cstc2017shmsA130043)

* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析、药动学。电话:023-68765495。E-mail:ymjxnyy@163.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药理学、药物分析、药动学。电话:023-68754462。E-mail:zwmcy@163.com

(收稿日期:2017-11-03 修回日期:2017-12-21)

(编辑:张静)