

文章编号：(2008)01-0001-05

注射用丹参酮 A 磺酸钠的制备及其对神经元的药理活性研究

相会欣¹, 王淑君¹, 王思玲¹, 邹瑜¹, 张春媛²

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 制备注射用丹参酮 A 磺酸钠, 建立神经元缺氧模型, 考察丹参酮 A 磺酸钠对缺氧造成的神经元损伤的保护作用。方法 以质量浓度为 80 mg·mL⁻¹ 的甘露醇作为支撑剂, 冷冻干燥法制备注射用丹参酮 A 磺酸钠。体外培养大鼠皮层神经元, 建立神经元缺氧模型, 给药后 24 h 后采用 MTT 法测定神经元细胞的活性。结果 制备的冻干粉针复溶性良好, 浓度为 0.1、1.0、10 μmol·L⁻¹ 的丹参酮 A 磺酸钠可显著提高缺氧神经元细胞的活性。结论 注射用丹参酮 A 磺酸钠对缺氧造成的神经元损伤具有保护作用, 可用于治疗因脑缺氧引起的疾病。

关键词: 药剂学; 冷冻干燥; MTT 法; 丹参酮 A 磺酸钠

中图分类号: R943 **文献标志码:** A

丹参酮 A 磺酸钠(sodium tanshinone IIA sulfonate, 以下简称 STS)是从丹参中提取的有效成分丹参酮 A, 经磺化后得到的水溶性化合物。临床试验结果表明, STS 对改善冠心病、心绞痛和胸闷等症状有显著疗效^[1-3], 同时, STS 还具有抑制阿霉素诱导的脂质过氧化^[4]、抑制肾间质纤维化来源的成纤维细胞的体外增殖^[5]等药理活性。有关 STS 对大鼠皮层神经元药理活性方面的研究未见报道。

本文作者制备了注射用 STS 粉针, 该剂型有助于增加药物的稳定性, 便于储存和运输。考察了该制剂对缺氧所致大鼠皮层神经元的药理作用, 为临床应用提供一定的科学依据。

1 仪器与材料

FD-1 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); SWC- 数字贝克曼温度计(南京桑力电子设备厂); 洁净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); 倒置显微镜(南京江南光电股份有限公司); CO₂ 恒温培养箱(美国 Nuair 公司); 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 酶标仪(美国 Tecan 公司); 重蒸水器(天津泰斯公司); 气体混合器(长沙长锦科技有限公司)。

注射用 STS(沈阳药科大学药学院自制, 规格: 10 mg/支); 甘露醇(天津市远航化学品有限公司); 山梨醇、葡萄糖、乳糖、蔗糖、氯化钠(天津博迪化工有限公司); 右旋糖苷(山东淄川制药厂); 柠檬酸(沈阳正信高科技研究所试剂部); IMDM 培养基、DMEM 培养基(美国 HyClone 公司); 胎牛血清(天津 TBD 公司); 胰酶(北京经科试剂公司); 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司)。

Wistar 孕鼠, 孕期 17~19 d, 沈阳药科大学动物实验中心提供。

收稿日期: 2007-04-26

作者简介: 相会欣(1979-), 女(汉族), 河北新乐人, 硕士研究生, Tel. 15833213351, E-mail xianghuixin@163.com; 王淑君(1972-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药新剂型的开发与药物动力学的研究, Tel. 024-23986360, E-mail xiaohu6408_cn@sina.com。

2 方法与结果

2.1 注射用 STS 的制备

2.1.1 支撑剂的选择

分别以质量浓度为 $60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甘露醇、右旋糖苷、乳糖、蔗糖、葡萄糖、山梨醇、氯化钠为辅料制备小样冻干粉针，对外观及复溶性进行考察。结果显示以蔗糖、葡萄糖、山梨醇、氯化钠为支撑剂的样品表面塌陷、起泡、不饱满；以右旋糖苷、乳糖为支撑剂的样品复溶性差；以甘露醇为支撑剂的样品表面较平整，复溶性好，故拟定以甘露醇作为冻干粉针的支撑剂。

2.1.2 支撑剂用量的考察

分别考察了 60、80、100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甘露醇为支撑剂时冻干粉针的外观及复溶性，结果见表 1。

Table 1 The effect of mannitol concentration to STS

$c/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Appearance	Re-solubility/s	Moisure content/%
60	coarse, crack	10	3.2
80	smooth, no crack	10	2.1
100	smooth, no crack	11	2.0

结果表明，上述 80、100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 两种质量浓度的甘露醇制成的样品外观均符合要求，但从生产成本的角度考虑，确定加入 80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甘露醇为支撑剂。

2.1.3 活性炭用量的考察

按浓配法配制成 STS 药液，分别加入质量浓度为 1、2、3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭，滤过，加入剩余注射用水至处方量，以药液的澄明度、含药量为指标进行考察，结果表明：3 个比例的活性炭用量对主药含量的影响均不大，且药液澄明度均符合规定，故处方中活性炭用量确定为 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.4 低共熔点的测定及冻干曲线的设计

采用降温法绘制热分析步冷曲线，测定 STS 药液的低共熔点，测得 STS 药液的低共熔点为 -1.11 。结果见图 1。

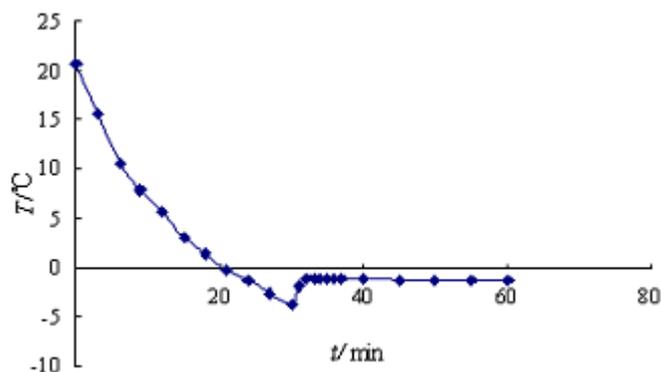


Fig.1 Eutectic point of STS

2.1.5 注射用 STS 处方及制备工艺

确定注射用 STS 的处方为 : STS 5.0 g、甘露醇为 80 g、注射用水 1 000 mL。制成 STS 冻干粉针 500 支。在 1 000 mL 烧杯中加入处方量的 STS 原料和甘露醇, 搅拌下加入约 800 mL 注射用水, 至其完全溶解, 再加入 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭, 于 45°C 恒温 30 min。将上述液体转移至 1 000 mL 量筒中, 用注射用水洗涤烧杯, 补足至 1 000 mL, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 制得质量浓度为 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液, 分装至 10 mL 的西林瓶中, 每支 2 mL。将西林瓶置于 -40°C 的冷冻箱中, 将样品冷至预冻温度后, 保持此温度冷冻 5 h。抽真空, 压力小于等于 20 Pa, 程序升温, 在 -15°C 时保持 5 h。升温干燥至 25°C 并保持 5 h, 冻干后封口即得。冻干后产品成形性、复溶性良好, 含水量低于 2%。

2.2 注射用 STS 对神经元的药理活性

2.2.1 大鼠皮层神经元的培养

将怀孕 17~19 d 的大鼠脱臼处死, 无菌条件下取出胎鼠, 超净台前取出胎鼠大脑, 置于冰浴的 DMEM 培养液中, 剔除软脑膜及血管, 分离大脑皮层。将分离的大脑皮层剪碎, 胰酶消化 5 min, 离心($1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 5 min, 弃去上清液, 用 IMDM 培养液(含质量分数为 10% 的胎牛血清)轻轻吹打分散成细胞悬液, 细胞悬液经 $71\ \mu\text{m}$ 金属细胞筛过滤, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 将细胞接种于预先用多聚赖氨酸覆盖过的 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 置 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中孵育。18~22 h 后换新鲜的加有质量分数为 1% (w) 的阿糖胞苷的 IMDM 培养液, 24 h 后半换液。以后隔天换液, 细胞培养 5~6 d, 用于缺氧性实验。

2.2.2 缺氧模型的建立

细胞培养 5~6 d, 根据实验要求将 96 孔板分为空白对照组和缺氧模型组。空白对照组换入含有葡萄糖的 Earle's 液后置于 5% (φ) 的 CO_2 培养箱中孵育 24 h。缺氧模型组换入不含葡萄糖的 Earle's 液, 然后把培养板置于缺氧罐内, 通入 95% (φ) 的 N_2 和 5% (φ) 的 CO_2 混合气体 20 min, 缺氧状态持续 24 h。

2.2.3 给药方案的确定

实验分为空白组、模型组和注射用 STS 不同浓度组。实验各组均换为无血清的 IMDM 培养液,

给药组加入不同浓度的 STS,置于 5%(φ)的 CO₂培养箱孵育 24 h,空白对照组换成含有葡萄糖的 Earle's 液,缺氧模型组换成不含葡萄糖的 Earle's 液,然后把培养板置于缺氧罐内,通入 95%(φ)的 N₂和 5%(φ)的 CO₂混合气体 20 min。24 h 后,每孔加入 MTT 溶液 10 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 在 5%(φ)的 CO₂培养箱中孵育 4 h,吸出原液,每孔再加入 DMSO 溶液 100 μ L,微微振荡 10 min,用酶标仪在 492 nm 波长处测定光密度值(OD)。

实验结果表明,注射用 STS 不同给药组对正常培养条件下神经元无损伤(见表 2)。在 0.1、1.0、10.0 μ mol·L⁻¹ 给药浓度(以 STS 计)下,注射用 STS 对缺氧神经元均有显著的保护作用(见表 3)。

Table 2 Effects of STS on the viability of primary cultured neurons($\bar{X} \pm s$)

Group	c/(μ mol·L ⁻¹)	OD
control	0	100.0 \pm 9.37
STS	0.1	110.49 \pm 7.21
	1.0	114.10 \pm 11.80
	10.0	105.57 \pm 8.82

Table 3 Effects of STS on the injury of primary cultured neurons induced by hypoxia($\bar{X} \pm s$)

Group	c/(μ mol·L ⁻¹)	OD
control	0	100.0 \pm 9.37
model	0	45.25 \pm 2.05 ^{###}
STS	0.1	104.92 \pm 15.96 [*]
	1.0	99.34 \pm 16.17 [*]
	10.0	125.90 \pm 14.69 ^{**}

^{###} $P < 0.001$, compared with the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with the model group

3 结论

a. STS 在临床上广泛应用于心血管方面疾病的治疗,陈维洲等^[6]曾报道 STS 能显著延长小鼠在缺氧情况下的存活时间。本文作者通过冷冻干燥制备了注射用 STS,采用 MTT 法测定了对大鼠皮层神经元的活性。结果表明,自制的注射用 STS 对缺氧神经元具有保护作用,能显著提高缺氧所致大鼠神经元的细胞活性,且未表现出剂量依赖性。

b. 脑部血液供应是维持机体生命活动,特别是维持高级神经活动的重要条件。大脑的能量来源主要依靠葡萄糖的有氧氧化,因此,只有连续不断的向脑内输送血液,才能维持脑的正常功能。脑

缺血缺氧可引起神经元的坏死或凋亡,就会出现相应的症状和体征,导致脑功能严重损害,出现智能与意识的障碍。本实验通过原代培养大鼠神经元细胞,建立缺氧模型,以神经元的活性作为检测指标,考察注射用 STS 的抗缺氧能力,在细胞水平为 STS 的抗缺氧药理活性研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 上海丹参 201 临床协作组. 丹参酮 A 磺酸钠注射液治疗 108 例冠心病疗效观察[J]. 中草药通讯, 1978(1): 37-39.
- [2] 陶钦洪, 贾连旺. 丹参酮 A 磺酸钠注射液对冠心病心肌缺血的治疗作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14 (19): 2507-2509.
- [3] 许春莹. 丹参酮 A 磺酸钠注射液治疗不稳定型心绞痛临床疗效观察[J]. 中国医刊, 2006, 41(5): 44-45.
- [4] ZHOU Guang-yin, ZHAO Bao-lu, HOU Jing-wu, et al. Protective effects of sodium tanshinone A sulfonate against adriamycin-induced lipid peroxidation in mice hearts *in vivo* and *in vitro*[J]. Pharmacol Res, 1999, 40(6): 487-491.
- [5] 孙兴旺, 曹灵, 于国华. DS-201 对 hR IFs 体外增殖及 cyclinD 1 基因表达的影响[J]. 山东医药, 2006, 46(28): 48-49.
- [6] 陈维洲, 董月丽, 汪长根. 丹参酮 A 磺酸钠的药理研究[J]. 药学学报, 1979, 14(5): 277-283.

Preparation of sodium tanshinone IIA sulfonate for injection and its pharmacological activity on neurons

XIANG Hui-xin¹, WANG Shu-jun¹, WANG Si-ling¹, ZOU Yu¹, ZHANG Chun-yuan²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China ; 2. School of Pharmacy, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

Abstract: Objective To prepare sodium tanshinone IIA sulfonate for injection and study the effects of sodium tanshinone IIA sulfonate on rat cortical neuron damage induced by ischemia. **Methods** Eighty mg·mL⁻¹ mannitol was selected as excipient. Sodium tanshinone IIA sulfonate for injection was prepared by freeze-drying method. Rat cortical neuron was cultivated *in vitro*, and ischemia model of neuron was established. Cell viability was detected by MTT method at 24 h after administration. **Results** The clarity was good after sodium tanshinone IIA sulfonate redissolved in water. Sodium tanshinone IIA sulfonate (0.1, 1.0, 10 μmol·L⁻¹) could increase cell activity of neuron. **Conclusion** Sodium tanshinone IIA sulfonate for injection can protect neuron cell against damage. It may be used to treatment brain ischemia disease in clinical.

Key words: pharmaceuticals; lyophilization; MTT method; sodium tanshinone IIA sulfonate

(本篇责任编辑:秦昕)