

天麻素在大鼠脑、肝、肾及脑不同区域组织匀浆中的代谢研究

王俏^{1,2}, 陈国神¹, 曾苏² (1.浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 研究天麻素在大鼠脑、肝、肾和脑不同区域组织匀浆中的代谢。方法 采用体外匀浆孵育, 高效液相法测定天麻素代谢物。结果 在脑、肝、肾匀浆中, 天麻素代谢物昔元(对羟基苯甲醇)的生成反应速度常数分别为 0.030 5, 0.012 1, 0.140 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 天麻素在大鼠脑、肝和肾匀浆中的清除率分别为 (29.7 ± 2.1) , (10.4 ± 0.8) 和 $(299.5\pm 22.7)\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。天麻素在脑、肝匀浆中代谢较慢, 在肾匀浆中能被迅速代谢。在脑组织不同区域中, 天麻素被代谢生成昔元的反应速度常数以小脑、脑桥与延脑、丘脑 3 个区比较高, 皮层、纹状体、海马 3 个区比较低, 前者为后者的约 1.5 倍。天麻素在大鼠小脑、丘脑、皮层中的清除率分别为 (45.9 ± 7.4) , (39.6 ± 5.6) 和 $(24.4\pm 3.0)\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论 天麻素在非酶体系中稳定, 在肝、肾、脑组织匀浆中天麻素可被代谢为天麻昔元。在组织中的代谢, 以肾最快, 脑次之, 肝最小; 在脑组织中, 天麻素在小脑、丘脑、脑桥与延脑区域代谢速度快于皮层、纹状体和海马区。

关键词: 天麻素; 天麻昔元; 对羟基苯甲醇; 匀浆; 体外代谢; 脑

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)08-0614-06

Study on the Metabolism of Gastrodin in Rat Brain, Liver, Kidney and Different Brain Regions Homogenate

WANG Qiao^{1,2}, CHEN Guoshen¹, ZENG Su² (1.Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the metabolism of gastrodin (Gas) in rat brain, liver, kidney and different brain regions. **METHODS** Gas was incubated in different tissue homogenate at 37°C *in vitro*. An HPLC method was established to determine the metabolite concentration after incubation. **RESULTS** The results showed the velocity constants of formation metabolite, HBA, were 0.030 5, 0.012 1 and 0.140 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in brain, liver and kidney, respectively. The clearance rates of Gas were (29.7 ± 2.1) , (10.4 ± 0.8) and $(299.5\pm 22.7)\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in the brain, liver and kidney, respectively. The metabolism rate of Gas was slow in brain and liver, while it was fast in kidney. In brain homogenate, the formation velocity of HBA was fast in the cerebellum, thalamus, pons and medulla oblongata, and slow in the frontal cortex, hippocampus and striatum. The velocity constants of the formers were about 1.5 times higher than those of the latters. Clearance rates of Gas were (45.9 ± 7.4) , (39.6 ± 5.6) and $(24.4\pm 3.0)\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in cerebellum, thalamus and cortex, respectively. **CONCLUSION** Gas is stable in non-enzyme system and can be metabolized to HBA in brain, liver and kidney homogenate *in vitro*. And Gas is metabolized most rapidly in the kidney. The metabolism rates of Gas in the cerebellum, thalamus, pons and medulla oblongata are faster than other three brain regions.

KEY WORDS: gastrodin; gastrodigenin; p-hydroxybenzyl alcohol; homogenate; metabolism *in vitro*; brain

基金项目: 浙江省科技计划项目(2007C33074); 浙江省卫生厅青年科技人才基金(2009QN001)

作者简介: 王俏, 女, 博士, 副研究员 Tel: (0571)88215623 E-mail: wangqiao-1@163.com

天麻素(gastrodin, Gas)为名贵药材天麻的有效单体^[1-2],具有镇静、镇痛、抗惊厥、抗癫痫、保护神经细胞等功能^[3-10],临床上应用于神经衰弱、眩晕、头痛的治疗及癫痫的辅助治疗,最近还发现其对血管性痴呆有效^[11-12]。

有人认为Gas本身并无中枢作用,需要代谢为昔元(对羟基苯甲醇, p-hydroxybenzyl alcohol, HBA)后才发挥作用,因为代谢物HBA具有脂溶性,易透过血脑屏障入脑,可与脑部的苯二氮革受体结合^[13]; Gas也可部分透过血脑屏障后,在脑内代谢为HBA而发挥作用^[14]。近年研究认为Gas和HBA对神经都有保护作用,有利于记忆的巩固和恢复,抗氧化和清除自由基等活性^[3-4,15-16]。

Gas在肝、肾、脑等主要脏器组织匀浆中的代谢情况,早期用薄层色谱法进行了检测^[17],肾的水解作用最强,其次为肝和脑。但薄层色谱法灵敏度低且无法定量测定代谢产生的HBA。另外Gas在脑不同区域中的代谢尚未见文献报道。本研究采用高效液相法检测Gas在体外脏器匀浆中的代谢情况,可准确地检测Gas代谢为HBA的量,旨在通过研究Gas在脑、肝、肾组织匀浆及脑组织不同区域匀浆的代谢,阐明Gas在体内脏器特别是脑中的代谢,为Gas作用机制研究提供帮助。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

岛津LC-10A高效液相色谱仪,双泵,SCL-10A系统控制器,SPD-10A紫外检测器,CTO-10A恒温箱,浙大N2000色谱工作站(浙江大学智能工程研究所)。离心机:上海安亭科学仪器厂(TGL-16C)。水浴恒温振荡器(SHZ-82型,江苏省太仓医疗器械厂)。手持式匀浆仪(PRO200,美国PRO Scientific Inc.)。紫外可见分光光度计(TU1800,北京普析通用仪器有限责任公司)。

Gas(纯度>99.0%)由广东惠州市东方植物保健科技有限公司提供;HBA(纯度>99.5%)由江苏省仪征市鼎信化工有限公司提供;乙腈为色谱纯(Merck KGaA, Germany);水为双蒸水;其他试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

分析柱: Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(2.5:97.5); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 221 nm; 柱温: 33 °C。

1.3 组织匀浆的制备

参照文献方法^[18-19],取Sprague-Dawley大鼠(由浙江省实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(浙)2003-0001),♂,体重220~250 g,制备组织匀浆前,动物禁食过夜。次日断头处死,取出肝脏、肾、脑(均在4 °C以下操作),置在冰袋上,用生理盐水洗净,滤纸吸干,称重后加入3倍于器官重量的磷酸生理盐水缓冲液(pH 7.4)^[20],于冰浴中制成匀浆。脑不同区域匀浆为取几只大鼠的脑组织,仔细分离脑的不同区域:脑皮层、纹状体、海马区、丘脑、小脑、脑桥与延脑六个区,同上制成匀浆。以Lowry法测定匀浆液的蛋白质浓度^[21]。

1.4 分析方法建立

精密称取HBA对照品,用甲醇制成1.90 mg·mL⁻¹贮备液。将贮备液用水稀释成系列标准溶液。精密吸取标准溶液10 μL,加入至90 μL加热灭活的组织匀浆中,混匀,加入100 μL甲醇沉淀蛋白,10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液20 μL,直接进HPLC测定。

1.5 体外代谢实验

将4.34 mg·mL⁻¹的Gas水贮备液稀释成一系列的标准水溶液,浓度范围为0.14~4.34 mg·mL⁻¹,置-20 °C保存。

取各组织匀浆液1 mL置于5 mL玻璃试管中,加Gas水溶液(浓度为2.17 mg·mL⁻¹)50 μL(使成103.3 μg·mL⁻¹浓度),迅速分装于0.5 mL的离心管中(每管100 μL),在37 °C的恒温振荡器上振荡,于30, 60, 90, 120, 150, 180 min取样,各样品中分别加入100 μL甲醇沉淀蛋白,10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,直接进HPLC测定。同时进行相同浓度Gas于缓冲溶液中37 °C振荡的实验,观察Gas是否水解。

分别精密取100 μL各组织匀浆置0.5 mL的离心管中,精密加入5 μL的不同浓度的Gas水溶液,迅速混匀,使Gas终浓度为6.5~206.7 μg·mL⁻¹(22.6~722.6 μmol·L⁻¹),置于37 °C的恒温振荡器上振荡,脑、肝组织匀浆中孵育120 min,肾组织匀浆中孵育60 min,同体积甲醇(105 μL)沉淀蛋白,测定HBA的生成浓度。

2 结果

2.1 HPLC分析大鼠组织匀浆中Gas代谢物HBA

2.1.1 专属性 取空白加热灭活的大鼠组织匀浆液和样品组织匀浆液加甲醇沉淀蛋白,离心后上清液进HPLC测定,所得色谱图见图1。从图中可以看出,

在选用的色谱条件下, HBA 在 3 种匀浆中均无干扰, 有较好的专属性。所以本法可用于测定 HBA。

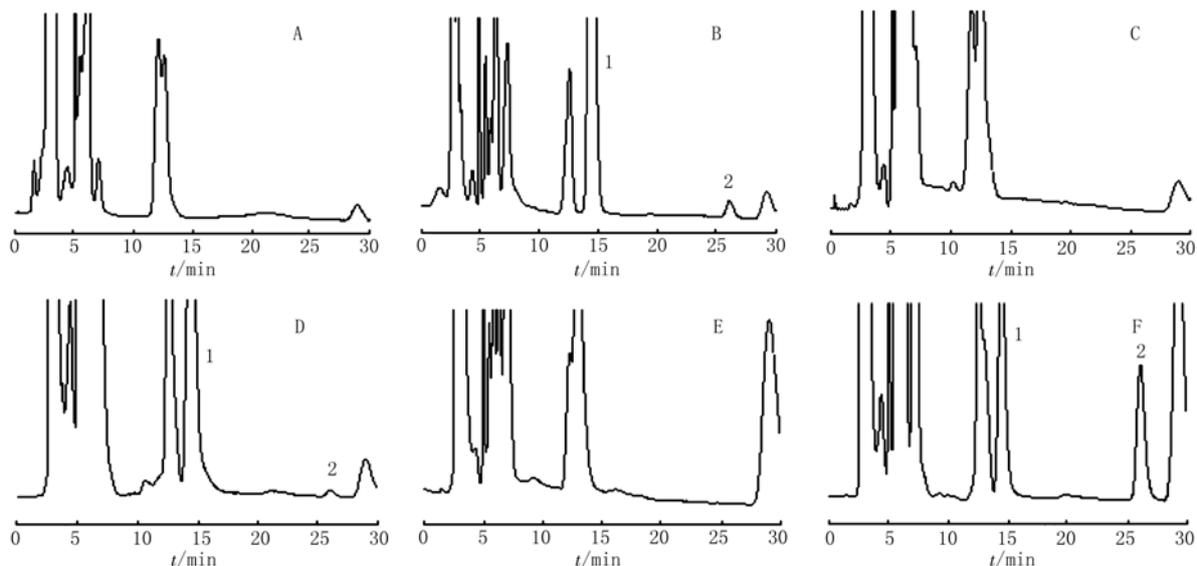


图 1 高效液相色谱图

A-空白脑匀浆; B-脑匀浆加 Gas 孵育 60 min; C-空白肝匀浆; D-肝匀浆加 Gas 孵育 60 min; E-空白肾匀浆; F-肾匀浆加 Gas 孵育 60 min; Gas 初始浓度为 $103.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1-Gas; 2-HBA

Fig 1 HPLC chromatogram

A-blank brain homogenate; B-brain homogenate sample incubated 60 min; C-blank liver homogenate; D-liver homogenate sample incubated 60 min; E-blank kidney homogenate; F-kidney homogenate sample incubated 60 min. The initiate concentration of Gas was $103.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1-Gas; 2-HBA

2.1.2 标准曲线 建立各灭活匀浆中 HBA 的标准曲线, 以 HBA 的峰面积与浓度进行回归分析。结果表明, HBA 在 $0.30\sim 18.96 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (脑匀浆)、 $0.30\sim 9.48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (肝匀浆)、 $0.59\sim 75.86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (肾匀浆)浓度范围有良好的线性关系, 各匀浆中的回归方程为: 脑匀浆: $Y=664.185 + 18\ 563.211 X$; 肝匀浆: $Y=520.097 + 18\ 537.068 X$; 肾匀浆: $Y=171.746 + 18\ 365.315 X$ 。 $n=3$, r^2 均大于 0.999。在脑、肝、肾匀浆中的定量下限分别为 $(0.290 \pm 0.045)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(0.307 \pm 0.030)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(0.627 \pm 0.047)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.3 精密度、准确度和绝对回收率 取各组织灭活匀浆, 制成肾中含 HBA 浓度为 1.18, 9.48 和 $37.93 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品, 脑中为 0.59, 2.37 和 $9.48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 肝中为 0.30, 1.18 和 $4.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 连续 3 d 重复操作考察方法的日间精密度, 同一天平行操作 5 次考察方法的日内精密度。准确度以计算浓度与理论浓度的比值来表示。

另取相同浓度的 HBA 标准水溶液加同体积的甲醇稀释后进行 HPLC 测定, 记录峰面积。计算同浓度样品与水溶液中的 HBA 峰面积的比值即为该浓度药物在组织匀浆中的绝对回收率。

HBA 的精密度、准确度和绝对回收率测定结果见表 1。

表 1 HBA 在匀浆中的精密度、准确度和绝对回收率

Tab 1 Intra- and inter-day precision, accuracy and absolute recovery of HBA in homogenate

组织	浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	精密度 RSD/%		准确度 /%	绝对回收率/%
		日 (n=5)	日 (n=5)		
脑	0.59	6.7	7	98	95.6
	2.37	1.5	1	99	96.6
	9.48	1.0	1	98	99.4
	0.59	9.6	12	103	91.9
	1.18	2.2	2	104	90.9
	4.74	1.9	2	98	96.0
肾	1.18	2.1	2	105	89.9
	9.48	1.3	1	97	97.2
	37.93	1.3	1	101	95.4

2.1.4 贮备液和样品稳定性 考察了 Gas 在水溶液中的稳定性, Gas 降解会生成 HBA。Gas 在较高浓度时 $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 置 4°C 放置 1 个月没有降解; 3 个月后有 1%~2% 的降解; 置 -20°C 放置 3 个月没有降解。在低浓度时 ($19.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 室温下放置 24 h 稳定, 但是 3~4 d 后含量开始下降, 并有降解产物 HBA 出现。而放置于 -20°C 3 个月含量稳定, 未见有降解。说明 Gas 的降解与其浓度有关, 浓度高会抑制其降解, 温度对其稳定性有一定的影响, 低浓度的 Gas 置于 -20°C 可较长时间保存。本试验中孵育液样品用甲醇沉淀离心后的上清液立即用 HPLC 测定或置 -20°C 保存 2 d 内测定完毕。

HBA 在水溶液中的稳定性较好, $1.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $37.93 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 水溶液置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 3 个月, 含量稳定。另各选用高低两个浓度考察 HBA 在脑(0.59 和 $9.48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)肝(0.59 和 $4.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、肾(1.18 和 $37.93 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组织灭活匀浆中经 3 次反复冻融和 10 h 室温放置的稳定性, HBA 在 3 种生物样品中稳定。

2.2 Gas 在大鼠脑、肝、肾组织匀浆中的代谢

2.2.1 代谢活性和反应-时间过程曲线 $103.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gas 在大鼠肾、肝、脑组织匀浆中孵育 30, 60, 90, 120, 180 min 后, 测定产生的 HBA, 见图 2。生成 HBA 的浓度-时间方程见表 2。

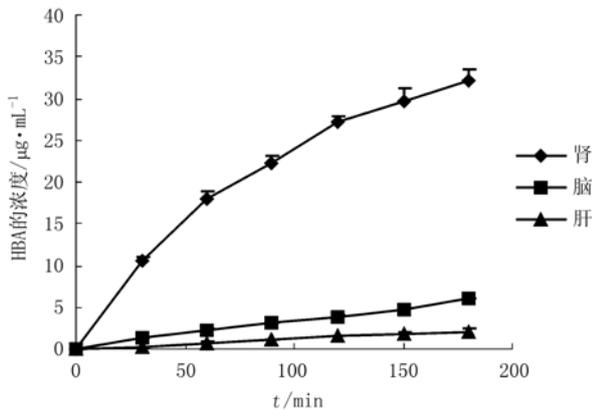


图 2 HBA 在脑、肝、肾匀浆中生成的浓度-时间曲线($n=4$)

Fig 2 The concentration-time curves of HBA in brain, liver and kidney homogenate ($n=4$)

表 2 在脑、肝、肾匀浆中代谢生成的 HBA 的回归方程($n=4$)

Tab 2 The regression equation of metabolite HBA in brain, liver and kidney homogenate ($n=4$)

组织	回归方程	相关系数	反应速率常数 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
脑	$C=0.0305t+0.3396$	0.9984	0.0305 ± 0.0007
肝	$C=0.0121t-0.0172$	0.9984	$0.0121\pm 0.0014^{1)}$
肾	$C=0.1409t+8.5438$	0.9793	$0.1409\pm 0.0086^{1)}$

注: $^{1)}P<0.01$ vs 脑

Note: $^{1)}P<0.01$ vs brain

由图 2 和表 2 可知, 孵育液中 $103.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gas 经 180 min 孵育后, 除肾有大量的代谢外, 脑、肝只有一小部分 Gas 被代谢。Gas($103.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即 $361.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在肾匀浆中代谢 3 h 后约有 71.8% 代谢为 HBA, 脑中约为 13.3%, 肝约为 4.7%。

Gas 在体外代谢仅生成 HBA, 在脑、肝匀浆中, Gas 浓度高, 而生成的代谢产物的浓度很低, 由于测定误差 Gas 浓度的减少不易计算, 本试验根据

HBA 生成的量计算 Gas 减少的量推出 Gas 的代谢回归方程, 可知 Gas 在肾中代谢速率约为脑的 9 倍, 而脑中代谢约为肝的 2.6 倍, 半衰期 $t_{1/2}$ 分别为: 脑 15.6 h、肝 41.5 h、肾 1.8 h。结果表明 Gas 在大鼠肾匀浆中的代谢较快, 而在脑和肝匀浆中的代谢较缓慢。

2.2.2 代谢动力学参数测定 $6.5\sim 206.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($22.6\sim 722.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Gas 在大鼠肾组织匀浆中代谢 1 h, $12.9\sim 206.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gas 在肝、脑组织匀浆中代谢 2 h, 产生 HBA 情况见图 3。

根据 Lineweaver-Burk 方程式: $1/v=K_m/v_{\max} \times [S] + 1/v_{\max}$, 以 $1/[S]-1/v$ 进行线性回归, 计算得到 Gas 在脑、肝和肾中的 K_m 、 v_{\max} 和 Cl_{int} 值见表 3。

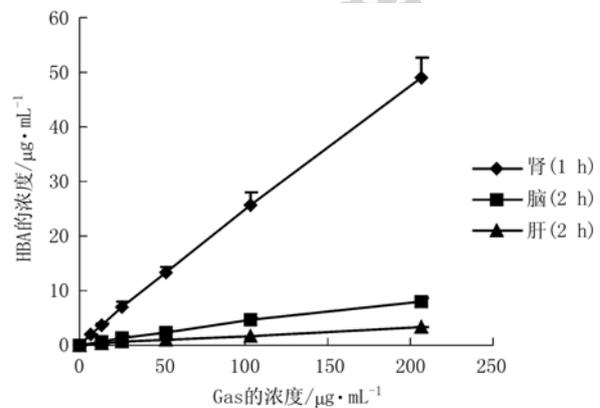


图 3 脑、肝、肾匀浆中不同 Gas 浓度代谢产生的 HBA 浓度曲线($n=4$)

Fig 3 The concentration of HBA versus concentration of Gas curve in brain, liver and kidney homogenate ($n=4$)

表 3 Gas 在脑、肝、肾匀浆中的代谢参数($n=4$)

Tab 3 Parameters of Gas metabolism in brain, liver and kidney homogenate ($n=4$)

组织	$v_{\max}/\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ $\times 10^{-3}$	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cl_{int} $/\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$
脑	30.2 ± 7.1	1020.0 ± 241.0	29.7 ± 2.1
肝	$11.8\pm 4.4^{1)}$	1155.5 ± 468.9	$10.4\pm 0.8^{1)}$
肾	$233.2\pm 69.4^{1)}$	791.9 ± 281.2	$299.5\pm 22.7^{1)}$

注: $^{1)}P<0.01$ vs 脑

Note: $^{1)}P<0.01$ vs brain

表 3 结果显示, 肾组织对 Gas 的代谢能力高于脑和肝组织。在相同的蛋白情况下($40 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 肾组织对于 Gas 的清除要远大于脑和肝组织。

2.3 Gas 在大鼠脑组织不同区域匀浆中的代谢

2.3.1 代谢活性和反应-时间过程曲线 Gas $103.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 在大鼠脑组织不同区域匀浆中的体外代谢 30, 60, 90, 120, 180 min 后产生 HBA 情况见图 4 和表 4。

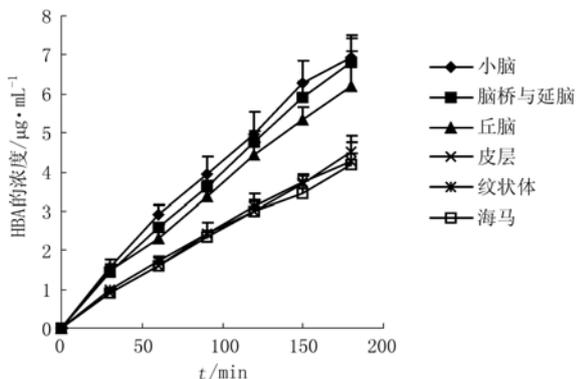


图4 不同脑区匀浆中生成的HBA浓度-时间曲线($n=4$)
Fig 4 The concentration-time curve of HBA in different brain region homogenate ($n=4$)

表4 不同脑区匀浆中代谢生成的HBA回归方程($n=4$)
Tab 4 The regression equation of metabolite HBA in different brain region homogenate ($n=4$)

组织	回归方程	相关系数	反应速率常数/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
皮层	$C=0.023\ 8t+0.188\ 5$	0.999 3	$0.023\ 8\pm 0.001\ 8$
纹状体	$C=0.022\ 1t+0.382\ 6$	0.998 4	$0.022\ 1\pm 0.001\ 9$
海马	$C=0.021\ 6t+0.308\ 0$	0.998 0	$0.021\ 6\pm 0.002\ 9$
丘脑	$C=0.032\ 0t+0.494\ 6$	0.999 2	$0.032\ 0\pm 0.006\ 3^{1)}$
脑桥与延脑	$C=0.036\ 2t+0.378\ 9$	0.999 6	$0.036\ 2\pm 0.004\ 3^{1)}$
小脑	$C=0.036\ 4t+0.606\ 0$	0.996 7	$0.036\ 4\pm 0.003\ 7^{1)}$

注: $^{1)}P<0.01$ vs 皮层、纹状体、海马
Note: $^{1)}P<0.01$ vs cortex, striatum, hippocampus

实验结果表明, Gas 在大鼠脑组织不同区域组织匀浆中代谢产生 HBA 的量以小脑、脑桥与延脑、丘脑 3 个区较多, 而在皮层、纹状体、海马 3 个区较少, 两组产生 HBA 的速率相差约 1.5 倍, 有极显著性差异($P<0.01$)。

2.3.2 代谢动力学参数测定 Gas $12.9\sim 206.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (即 $45.2\sim 722.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在大鼠脑皮层、丘脑、小脑不同区域中体外代谢 2 h 产生 HBA 情况见图 5 和表 5。

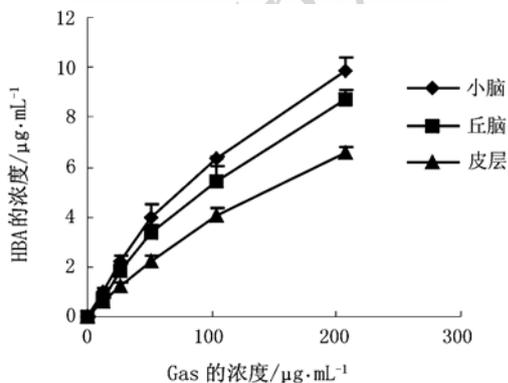


图5 不同脑区匀浆中 Gas 和生成的 HBA 浓度曲线($n=4$)
Fig 5 The curves of HBA formation in different brain region homogenates ($n=4$)

表5 不同脑区匀浆中 Gas 的代谢参数 ($n=4$)

Tab 5 Metabolism parameters of Gas metabolism in different brain region homogenates ($n=4$)

组织	$v_{\text{max}}/\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ $\times 10^{-3}$	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{im}}^1/\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$
皮层	30.1 ± 5.5	$1\ 267.6\pm 394.2$	24.4 ± 3.0
丘脑	27.3 ± 7.0	701.4 ± 207.2	$39.6\pm 5.6^{1)}$
小脑	35.8 ± 9.8	818.2 ± 367.5	$45.9\pm 7.4^{2)}$

注: $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ vs 皮层
Note: $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ vs cortex

由图 5、表 5 可见 Gas 在皮层、丘脑、小脑 3 个区中, 小脑和丘脑的清除率显著高于皮层。

3 讨论

3.1 组织匀浆比例的选择

采用 1:3 的匀浆比例(即 1 份组织加入 3 份的缓冲液), 孵育时蛋白终浓度约为 $40\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 能较好地检测到各时间点各浓度的底物代谢成 HBA 的量, 若减少缓冲液的体积, 组织蛋白浓度过高, 不利于 1 倍体积的甲醇沉淀蛋白, 若增加缓冲液的体积, 组织匀浆蛋白量减少, Gas 代谢成 HBA 也相应减少, 不利于 Gas 代谢成 HBA 情况的检测。

另外, 曾采用肾、肝、脑的 S9(蛋白终浓度为 $6\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 与 $103.3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gas, 孵育 180 min, 结果只在肾 S9 中观察到有代谢, 而脑 S9 和肝 S9 未观察到代谢; 制备肾、脑、肝微粒体(蛋白终浓度为 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 与 $103.3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gas, 孵育 180 min, 也未观察到代谢。实验表明, 代谢可能与蛋白浓度有关, 特别是在肝和脑中, 蛋白浓度的降低会使 Gas 的代谢大为减少, 直至检测不到 HBA。

3.2 Gas 孵育的稳定性和匀浆液的代谢活性

测定 Gas 在鼠脑、肝和肾匀浆中的代谢活性时, 同时进行了 Gas 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴振荡的情况下, 于同浓度缓冲溶液(不加匀浆液)中的稳定性实验。结果表明, Gas 在缓冲溶液中 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 6 h 未检测到 HBA。因此, Gas 在缓冲溶液中孵育是稳定的, 匀浆中的 HBA 的确是在匀浆酶的作用下水解产生的。

另外进行了 3 h 内不同时间点匀浆液中加入 Gas 孵育一定时间后的代谢实验, 结果表明匀浆液孵育 3 h, 没有出现对 Gas 代谢能力下降的情况。

3.3 天麻素在组织匀浆中的代谢差异

Gas 在肾中的代谢最强, 速度最快, 其次为脑、肝。大鼠的脑组织平均重为 $1.71\ \text{g}$, 肝约为脑的 4.7 倍, 肾约为脑的 1.2 倍, 考虑到大鼠的肝总重约为脑重的 5 倍, 脑的代谢虽然快于肝 3 倍, 但是静注、

口服等全身给药时外周即肝中的药物浓度会高于脑中的药物浓度, 所以不能排除肝脏代谢 Gas 成 HBA 的量比脑要多的可能。

脑组织不同区域对 Gas 的代谢速率不一样, 但不同区域的重量也有很大差别。脑皮层、纹状体、海马区、丘脑、小脑、脑桥与延脑 6 个区在脑中占的比例分别为(6 只大鼠的平均值): 42.7%、4.2%、6.1%、15.8%、12.0%、10.6%。其中皮层占全脑的比重最高, 丘脑、小脑次之, 这在 Gas 进入脑部后的代谢及其作用的侧重可能会有一定的关系。丘脑和小脑产生 HBA 的速率分别是皮层的 1.3 和 1.5 倍, 而皮层占全脑的比例是丘脑的 2.7 倍, 小脑的 3.6 倍, 所以皮层代谢产生的 HBA 在总量上来说可能不会低于丘脑和小脑, 推测 HBA 在皮层、丘脑、小脑的量较多。

总之, Gas 在肾中的代谢最强, 速度最快, 其次为脑, 而肝中代谢最低。Gas 在脑组织不同区域代谢为 HBA 的速率不一样, 以小脑、丘脑区为高, 皮层等区较低, 可能与其作用的主要部位有一定关系, 有待进一步的体内实验来证实。

REFERENCES

- [1] FENG X, CHEN Y, YANG J. Studies on constituents of Tian-ma [J]. Acta Chim Sin(化学学报), 1979, 37(3): 175-182.
- [2] ZHOU J, YANG Y, YANG T. The chemistry of gastrodia elata Bl. I. The isolation and identification of chemical constituents of gastrodia elata Bl [J]. Acta Chim Sin(化学学报), 1979, 37(3): 183-189.
- [3] WU C R, HSIEH M T, HUANG S C, et al. Effects of gastrodia elata and its active constituents on scopolamine-induced amnesia in rats [J]. Planta Med, 1996, 62 (4): 317-321.
- [4] HSIEH M T, WU C R, CHEN C F. Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats [J]. J Ethnopharmacol, 1997, 56(1):45-54.
- [5] KIN H J, MOON K D, OH S Y, et al. Ether fraction of methanol extracts of gastrodia elata, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus [J]. Neurosci Lett, 2001, 314(1-2): 65-68.
- [6] AN S J, PARK S K, HWANG I K, et al. Gastrodin decreases immunoreactivities of gamma-aminobutyric acid shunt enzymes in the hippocampus of seizure-sensitive gerbils [J]. J Neurosci Res, 2003, 71(4): 534-543.
- [7] LI Y, CHEN F, LIU G. Studies on inhibitive effect of gastrodin on PC12 cell damage induced by glutamate and H₂O₂ [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2003, 34(5): 456-460.
- [8] LIU Z, HU H, FENG G, et al. Protective effects of gastrodin on the cellular model of Alzheimer's disease induced by Abeta25-35 [J]. J Sichuan Univ(Med Sci Edi) (四川大学学报医学版), 2005, 36(4): 537-540.
- [9] OJEMANN L M, NELSON W L, SHIN D S, et al. Tian ma, an ancient Chinese herb, offers new options for the treatment of epilepsy and other conditions [J]. Epilepsy Behav, 2006, 8(2): 376-383.
- [10] ZENG X, ZHANG Y, ZHANG S, et al. A microdialysis study of effects of gastrodin on neurochemical changes in the ischemic/reperfused rat cerebral hippocampus [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(4): 801-804.
- [11] GUO H. Therapeutic effects of gastrodin hyperbaric oxygenation on the viability of multi-infarction dementia patients[J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2006, 4(9): 828-829.
- [12] WANG Z, WU G, WAN H, et al. Clinical observation of Gastrodin injection treating cognitive handicap[J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med(浙江中西医结合杂志), 2005, 15(11): 675-676.
- [13] GUO Z, TAN T, ZHONG Y, et al. Study of the mechanism of gastrodin and derivatives of gastrodigenin [J]. J West China Univ Med Sci (华西医科大学学报), 1991, 22(1): 79-82.
- [14] YOU J, TAN T, KUANG A, et al. Biodistribution and Metabolism of ³H-Gastrodigenin and ³H-Gastrodin in Mice [J]. J West China Univ Med Sci(华西医科大学学报), 1994, 25(3): 325-328.
- [15] WU C R, HSIEH M T, LIAO J. p-Hydroxybenzyl alcohol attenuates learning deficits in the inhibitory avoidance task: involvement of serotonergic and dopaminergic systems [J]. Chin J Physiol(中国生理学报), 1996, 39 (4): 265-273.
- [16] YU S J, KIM J R, LEE C K, et al. Gastrodia elata blume and an active component, p-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(6): 1016-1020.
- [17] LU G, ZOU Y, CHU D. Metabolism of gastrodin in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 1986, 2(2): 23-25.
- [18] CHENG C, ZHOU J, YAN G, et al. Metabolism of Sophoricoside in Homogenized Liver of Rats [J]. J Shanghai Second Med Univ(上海第二医科大学学报), 2005, 25(3): 232-234.
- [19] ZHOU M J, CHEN X Y, ZHONG D F. Metabolism of trans-resveratrol-3-O-glucoside *in vitro* in rat tissues [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2007, 42(5): 520-524.
- [20] XU S, BIAN R, CHEN X. Experiment technology of pharmacology (药理学实验方法) [M]. Vol 3. Beijing: People Sanitation Press, 2002: Appendix 1849.
- [21] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.

收稿日期:2008-09-26