DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.03.004

鱼藤酮微球制备及其诱导大鼠帕金森病模型的初步研究*

王英舟▲　刘梅芳　谢东锋▲　张春燕△
（济宁医学院药学院，日照 276826）

摘　要　目的　制备鱼藤酮微球，并对其质量进行评价。**方法**　采用乳化-溶剂挥发法制备鱼藤酮微球，利用扫描电镜观察其形态及粒度分布，HPLC 法测定包封率、载药量、体外释药曲线。按 2.5mg/kg 剂量给予大鼠颈部皮下注射鱼藤酮微球，对体重变化和行为活动进行统计和观察。**结果**　所得微球扫描电镜下呈圆球形，平均粒径 9.58μm，载药量为 40.39%，包封率为 85.72%，体外释药可达 7d，释药曲线符合一级动力学方程。微球给药方式对大鼠体重增长影响较小，给药后大鼠出现动作迟缓、弓背状姿势等帕金森病模型的典型特征。**结论**　本实验制备得到的鱼藤酮微球体外具有良好的缓释作用，微球给药显著降低了给药频率和造模死亡率，有望用于帕金森大鼠模型的研究。

关键词　鱼藤酮；聚乳酸-羟基乙酸共聚物；微球
中图分类号：R943；R742.5　**文献标识码**：A　**文章编号**：1000-9760(2018)06-167-04

Preparation and pilot study of rotenone microspheres used to establish Parkinson's disease rat model

WANG Yingzhou, LIU Meifang, XIE Dongfeng, ZHANG Chunyan
(*College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao* 276826, *China*)

Abstract: ***Objective***　To prepare rotenone microspheres and evaluate the quality. ***Methods***　Rotenone microspheres were prepared by emulsion-solvent evaporation method. The morphology and particle size distribution were observed by scanning electron microscope. The entrapment efficiency, drug loading rate and in vitro releasing rate were determined by HPLC. The rotenone microspheres were injected subcutaneously into the neck of rats at the dose of 2.5mg/kg, and the changes of body weight and behaviors were observed. ***Results***　The microspheres were spherical, with an average particle size of 9.58μm, drug loading rate of 40.39%, entrapment efficiency of 85.72%, and it could release for 7days in vitro. The release curve accorded with the first order kinetic equation. The microspheres drug delivery system had little effect on the growth of body weight in rats, and typical characteristics of Parkinson's disease were observed in rats. ***Conclusion***　Rotenone microspheres showed good sustained release effect in vitro, and it could significantly decrease the frequency of administration and the mortality of model rats, which was expected to be used in the establishment of Parkinson's rat model.

Keywords: Rotenone; PLGA; Microspheres

帕金森病（Parkinson's disease，PD）是一种常见的中老年神经系统变性疾病，其临床特征主要是静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势平衡性障碍，同时伴有抑郁、便秘和睡眠障碍等非运动症状，严重影响患者的生活质量。随着人口的老龄化，其发病率逐年上升，60 岁以上人群患病率约 1%[1-2]。PD 发病机制目前未明确，其研究模型处在不断改进中。Betarbet 等[3]建立的鱼藤酮帕金

*［基金项目］2016 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目（201610443020）；2016 年济宁医学院大学生创新训练计划项目（cx2016020）
△［通信作者］张春燕，E-mail：zhangchunyan203@126.com
▲ 王英舟，济宁医学院药学院 2015 级学生
▲ 谢东峰，济宁医学院药学院 2016 级学生

森病大鼠动物模型，具有选择性多巴胺能神经元受损、残存多巴胺能神经元内出现 lewy 小体、多巴胺能神经元进行性损伤等一系列帕金森病核心特征，受到帕金森病研究者的广泛重视。该模型的制作方法有颈静脉手术埋泵法[4]，长期低剂量皮下注射法[5-6]等，造模成本高，耗时长，成功率低，限制了它的应用与发展。

微球是指药物分散或吸附在高分子聚合物基质中形成的微小球状实体，具有长效缓释作用[7]。本实验采用乳化-溶剂挥发法，制备鱼藤酮微球，并对其质量进行考查，拟将其应用于 PD 大鼠造模，以期降低动物造模过程中给药频率，减小动物造模过程中的死亡率。

1　材料与仪器

1.1　仪器

Mastersizer 3000 粒度仪（英国马尔文公司）；EM-30PLUS 扫描电子显微镜（韩国 COXEM 公司）；XHF-D 高速分散器（宁波新芝生物科技股份有限公司）；B11-3 型恒温磁力搅拌器（上海司乐仪器有限公司）；LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；SHY-3 水浴恒温振荡器（金坛普林仪器制造有限公司）。

1.2　药品与试剂

鱼藤酮（陕西帕尼尔生物科技有限公司，批号 160101）；乳酸羟基乙酸共聚物（PLGA7525 4A，美国 Lakeshore Biomaterials 公司，批号 LP733）；PVA（Mw：13000 ~ 23000，水解度：87% ~ 89%，美国 Sigma-Aldrich 公司）；二氯甲烷（北京高纯科技有限公司，批号 20160722）；甲醇、乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

1.3　动物

SD 大鼠，雄性，200 ~ 250g，济宁医学院动物房提供，动物许可证号：SCXK（鲁）2014-0007，动物实验符合实验动物福利和动物伦理学要求。

2　方法与结果

2.1　鱼藤酮微球的制备

采用乳化-溶剂挥发法[8]制备鱼藤酮微球：精密称取适量鱼藤酮和 PLGA，加入二氯甲烷，涡旋使之溶解为均匀透明的油相（O）溶液，将油相缓慢加入到含有 1% PVA 的水相（W）中，在 2800r/min 转速下通过高速分散器高速剪切 2.5min 形成 O/W 型乳液，后加入 0.1% PVA 水溶液中，继续低速搅拌 4h，挥发有机溶剂，并固化微球。采用合适筛子收集微球，用纯化水洗涤 3 ~ 5 次后，真空干燥，得鱼藤酮微球。

2.2　微球形态、粒度分布检查

采用扫描电子显微镜（SEM）观察微球外观形态，并用激光粒度仪测定鱼藤酮微球粒径分布，结果见图 1、图 2。电镜扫描结果显示微球形态圆整，表面光滑。粒度测定结果显示，鱼藤酮微球平均粒径为 9.58μm，径距为 1.15。

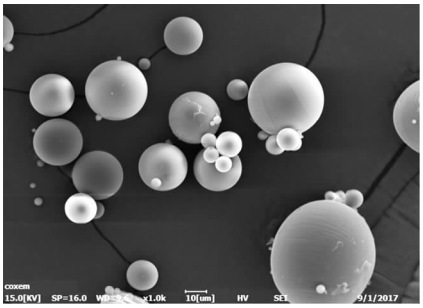

图 1　鱼藤酮微球扫描电镜照片（×1000）

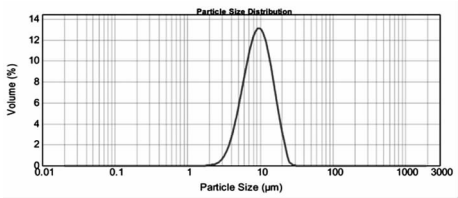

图 2　鱼藤酮微球粒径测量结果

2.3　鱼藤酮微球载药量和包封率的测定

2.3.1　色谱条件　色谱柱：C18 柱（200mm × 4.6mm，5μm），流动相：乙腈：水为 1∶1，检测波长：290nm，流速：1.0ml · min^{-1}，柱温：30℃，进样量：100μl。

2.3.2　标准曲线的绘制　精密称取鱼藤酮适量，配制一系列不同浓度的鱼藤酮二甲亚砜溶液。将样品溶液用微孔滤膜过滤后进 HPLC 测定，以峰面积对浓度进行线性回归，得回归方程为：A = 51374C + 67941（R^2 = 0.9999），鱼藤酮在 2.0 ~ 120mg · L^{-1}范围内峰面积与浓度线性关系良好。

2.3.3　载药量和包封率的测定　精密称取鱼藤酮微球 10mg，溶解到 5ml DMSO 中，用流动相稀释定容后，进 HPLC 测定峰面积，并按以下公式计算载药量和包封率：

载药量（%）= 微球中药物重量/微球总重量 ×100%

包封率(%) = 微球实际载药量/理论投药量 ×100%

按照实验处方工艺,制备 3 批鱼藤酮微球,测得 3 批微球平均载药量和包封率分别为 40.39% 和 85.72%。

2.4　鱼藤酮微球体外释放度测定

精密称取鱼藤酮微球适量置于 50ml 具塞离心管中,加入一定体积的释放介质,涡旋 1min 后放入 37℃、50r · min^{-1}恒温水浴振荡器中,分别于 1、2、4、6、8、24h 和 2、3、4、5、6、7d 取出离心管,室温下 8000r/min 离心 3min。取 10ml 上清液作为供试液,并向原溶液中补充 10ml 释放介质,涡旋 1min 后放入振荡器中振荡。将供试液按"2.3.1"项下色谱条件进行进样测定,并计算累积释放度。见图 3。

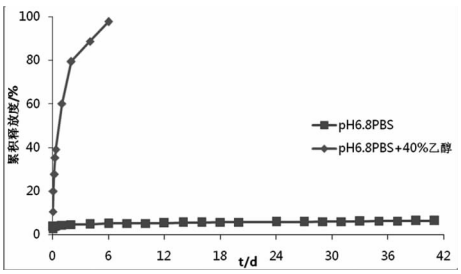

图 3　鱼藤酮微球体外释放曲线

由于鱼藤酮难溶于水,因此,鱼藤酮微球在 pH6.8 磷酸盐缓冲液中的溶解过程极其缓慢,41d 累积释放度仍不及 10%,因此,我们参考相关文献[3],将释放介质更改为 pH6.8 磷酸盐缓冲液和 40% 乙醇的混合溶液,在该混合溶液中,鱼藤酮微球释药平缓,第 7 天释药达到 100%。

2.5　鱼藤酮微球体外释药机理探讨

为了研究鱼藤酮微球的体外释放规律,分别按零级释放、一级释放、Higuchi 方程和 Weibull 分布模型对体外释放数据进行拟合。见表 1。

表 1　鱼藤酮微球在 pH6.8PBS(含 40% 乙醇)中的体外释放拟合结果

释药模型	拟合方程	相关系数(R^2)
零级释放	Y = 14.54881t + 25.76281	0.74701
一级释放	Y = 88.25149(1-e-1.69907t)	0.95409
Higuchi 方程	Y = 38.17959t1/2 + 13.53686	0.93431

体外释放度结果表明,鱼藤酮微球的体外释放行为更符合一级释放规律。

2.6　鱼藤酮微球诱导大鼠 PD 模型的建立

18 只 SD 大鼠随机分为空白组、微球组和每日注射组,每组 6 只。实验周期为 28d,给药方式为颈部皮下注射,剂量为 2.5mg/kg/d。空白组和每日注射组每日固定时间分别给予生理盐水和鱼藤酮葵花油溶液,微球组于第 1、8、15、22 天给予微球混悬液。3 组大鼠分别于给药后每隔 4d 称重,记录数据见图 4,给药频率和死亡情况统计表见表 2。

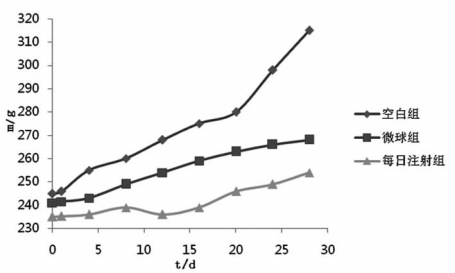

图 4　3 组大鼠的体重变化对比图

由图 4 可知,空白组大鼠体重增长率为 28.57%,微球组和每日注射组体重增长率分别为 11.20%、8.09%,提示微球给药方式对大鼠体重增长影响较小。

表 2　大鼠 PD 造模死亡数量统计

组别	给药频率	死亡数量	死亡率/%
空白组		0	0
微球组	每周 1 次	1	16.7
每日注射组	每天 1 次	2	33.3

微球组有 1 只大鼠于给药后第 3 天死亡,每日注射组有 2 只大鼠分别于给药后第 6 日和第 8 日死亡,由表 2 可知,微球给药显著降低了给药频率和造模死亡率。

实验过程中,给药的 2 组大鼠均在给药后出现动作迟缓、弓背状姿势,步态不稳等 PD 模型的典型特征。本实验过程中,按陈忻等[9]记分方法,微球组与每日注射组大鼠行为学记分均在 3 分以上,因此,进一步确认本文成功制备 PD 大鼠模型。

3　讨论

鱼藤酮是一种常见的线粒体复合体 I 抑制剂,具有较强的脂溶性,较易透过血脑屏障,从而具有多巴胺神经元的毒性。同时,鱼藤酮对于神经元的损伤是一个缓慢作用过程,能够使动物产生与帕金

森病 PD 较为相似的症状,较好地模拟临床上 PD 发病慢、进行性发展的特点[10]。因此,被国内外学者广泛应用于制备帕金森病动物模型。

鱼藤酮见光易分解。因此,本实验操作中需尽量避光操作,也有学者尝试将其制备成为纳米脂质体和包合物来提高其稳定性,降低毒性并减小个体差异。本文成功制备了鱼藤酮微球,并将其进行了 PD 大鼠造模的初步研究。研究表明鱼藤酮微球用于 PD 大鼠造模可以降低给药频率,减小动物死亡率,造模动物出现了 PD 大鼠的行为学典型特征。但系统的病理学以及药物代谢动力学实验还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 苏娜,吴斌,徐珽. 司来吉兰治疗帕金森病的有效性与安全性的系统评价[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(14):1206-1212. DOI:10. 13286/j. cnki. chinhosppharmacyj. 2014. 14. 17.

[2] 李子悦,尤浩军,孙志宏. 环境和遗传因素在帕金森病中的作用[J]. 延安大学学报:医学科学版,2017,15(1):70-72. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-2639. 2017. 01. 024.

[3] Ranjita B, Sherer TB, Gillian MK, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson'S disease[J]. Nat Neurosci, 2015, 3(12): 1301-1306. DOI:10. 1038/81834.

[4] Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, et a1. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and a Synuclein aggregation[J]. Exp Neurol, 2003, 179(1): 9-16. DOI: 10. 1006/exnr. 2002. 8072.

[5] 张玉梅. 长期低剂量皮下注射鱼藤酮制备多巴胺神经元损伤模型及其机制研究[D]. 大连:大连医科大学,2009.

[6] 马宝仓,陈忻. 鱼藤酮帕金森病动物模型及毒性机制研究进展[J]. 中药药理与临床,2013,29(1):164-169. DOI:10. 13412/j. cnki. zyyl. 2013. 01. 058.

[7] 周雪,薛雨晨,贺智勇,等. 阿司匹林 PEG-PLGA 缓释微球的制备以及体外释药的考察[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(22): 1889-1893. DOI: 10. 13286/j. cnki. chinhosppharmacyj. 2014. 22. 03.

[8] 甘晶瑶,梁荣才,刘沙,等. Notel 长效微球制剂的制备和评价[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(14):1185-1189. DOI:10. 13286/j. cnki. chinhosppharmacyj. 2016. 14. 09.

[9] 陈忻,张楠,赵辉,等. 鱼藤酮致帕金森病大鼠行为学与黑质病理损伤的关系[J]. 中国神经精神疾病杂志,2008,34(4):232-234. DOI:10. 3969/j. issn. 1002-0152. 2008. 04. 011.

[10] 李亚南,毛全高. 鱼藤酮纳米脂质载体及其修饰物在大鼠体内的分布[J]. 江苏大学学报(医学版),2016,26(4): 346-351. DOI: 10. 13312/j. issn. 1671-7783. y160102.

(收稿日期　2017-10-13)
(本文编辑:石俊强)

(上接第 166 页)

[11] Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Amiri S, et al. Involvement of N-methyl-d-aspartate receptors in the antidepressant-like effect of 5-hydroxytryptamine 3 antagonists in mouse forced swimming test and tail suspension test[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2016, 141: 1-9. DOI: 10. 1016/j. pbb. 2015. 11. 009.

[12] Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Amiri S, et al. Elevated level of nitric oxide mediates the anti-depressant effect of rubidium chloride in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 762: 411-418. DOI: 10. 1016/j. ejphar. 2015. 06. 030.

[13] Gould TD, Einat H. Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement[J]. Neurosci Biobehav Rev. 2007; 31(6): 825-831.

[14] Goldberg JF, Truman CJ. Antidepressant-induced mania: an overview of current controversies[J]. Bipolar Disord, 2003, 5(6): 407-420. DOI: 10. 1016/j. neubiorev. 2007. 05. 007.

[15] Ghasemi M, Montaser-Kouhsari L, Shafaroodi H, et al. nmDA receptor/nitrergic system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test[J]. Psychopharmacology (Berl), 2009, 206(2): 325-333. DOI: 10. 1007/s00213-009-1609-1.

(收稿日期　2018-02-10)
(本文编辑:石俊强)