文章编号:1000-5404(2010)03-0233-05

论著

咖啡酸衍生物的合成及其脑靶向性的研究

张 静[1],李 标[2],刘 戟[3],王 欣[4],王毓杰[1],李钰婷[4],张 艺[1],罗维早[4] (611137 成都,成都中医药大学民族医药学院[1];400038 重庆,西南药业股份有限公司[2];610041 成都,四川大学基础医学与法医学院[3];400065 重庆,重庆市中药研究院[4])

[摘要] 目的 咖啡酸衍生物的合成及其脑靶向性评价。**方法** 以浓硫酸为催化剂,咖啡酸与甲醇和乙醇直接反应合成咖啡酸甲酯和乙酯,咖啡酸在磷酸催化下与醋酐酰化得3,4-二乙酰基咖啡酸;并测定了咖啡酸及其衍生物在正辛醇-磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)系统中的分配系数;采用原代脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMVEC)和星形胶质细胞(astrocytes, AC)共培养建立的体外血脑屏障模型来评价其脑靶向性。**结果** 得到3个咖啡酸衍生物的油水分配系数均较咖啡酸高,亲脂性增强;其中咖啡酸甲酯和3,4-二乙酰基咖啡酸透过体外血脑屏障的能力较咖啡酸强。**结论** 所合成的3个化合物经MS、^{1}HNMR、IR和UV证实其结构;咖啡酸甲酯和3,4-二乙酰基咖啡酸能突破血脑屏障具有脑靶向性特点。

[关键词] 脑靶向;咖啡酸;血脑屏障
[中图法分类号] R282.71; R914.5; R961 **[文献标志码]** A

Synthesis of caffeic acid derivatives and their targeting on brain

Zhang Jing[1], Li Biao[2], Liu Ji[3], Wang Xin[4], Wang Yujie[1], Li Yuting[4], Zhang Yi[1], Luo Weizao[4] ([1]Medical College for Nationalities, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan Province, 611137; [2]Southwest Pharmacy Co. Ltd, Chongqing, 400038; [3]Huaxi Basic Medicine and Forensic Medicine College, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [4]Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, 400065, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the synthesis of caffeic acid derivatives and their targeting on brain. **Methods** Methyl and ethyl esters of caffeic acid were synthesized by direct reaction of caffeic acid to methanol and ethanol with sulfate acid used as a catalyst. 3, 4-diacetyl caffeic acid was synthesized by acetylating caffeic acid with phosphate acid used as a catalyst. Their partition coefficient (P) in 1-octanol-phosphate buffer system (pH 7.4) was detected. An *in vitro* blood brain barrier (BBB) model was established by co-culturing brain capillary endothelial cells (BMVEC) and astrocytes (AC) for the evaluation of their targeting on brain. **Results** The partition coefficients (P) of the three derivatives were much higher than that of caffeic acid, and their lipophilicity was stronger than that of caffeic acid. The potency of methyl ester of caffeic acid and 3, 4-diacetyl-caffeic acid across the *in vitro* BBB was better than that of caffeic acid. **Conclusion** The structure of three synthesized caffeic acid derivatives can be conformed by MS, ^{1}HNMR, IR, and UV spectra. Methyl ester of caffeic acid and 3, 4-diacetyl-caffeic acid can cross the BBB and can thus be used as brain targets.

[Key words] brain target; caffeic acid; blood brain barrier

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672602). Corresponding author: Luo Weizao, Tel: 86-23-89029026, E-mail: loweizao@163.com; Zhang Yi, Tel: 86-28-61800274, E-mail: 9006zmy@sina.com

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)控制血液中的物质选择性的进入脑组织和脑脊液。这虽然对保证脑内环境免受血液化学成分剧烈变动的影响,以维持中枢神经系统功能的稳定具有重要作用,但也使中枢神经系统疾病的治疗更为困难。

BBB的组织基础主要是脑毛细血管内皮细胞层[1,2],它排列紧密,阻碍大分子物质通过;从生化角度看,脑毛细血管内皮细胞膜是以类脂为基架的双分子层膜结构,具有亲脂性,易使脂溶性物质通过,而水溶性物质较难通过。要提高治疗中枢神经系统疾病的疗效,药物必须首先通过BBB,从循环血到达中枢神经系统的细胞外液并达到有效浓度。一般来说,药物能否通过BBB,取决于BBB的状态;药物的理化性质,即分子大小(相对分子质量小于600)、脂溶性、离解状态;药物与特异性载体蛋白结合能力以及生物酶转化

[基金项目] 国家自然科学基金(30672602)
[通信作者] 罗维早,电话:(023)89029026,E-mail:loweizao@163.com
张 艺,电话:(028)61800274, E-mail:9006zmy@sina.com

作用等的影响[3]。通常,在生理pH时不解离、相对分子质量小、脂溶性大的药物容易透过BBB;反之,则较难透过BBB。

咖啡酸是从菊科植物短葶飞蓬[*Erigeron breviscapus*(*Vant.*)*Hand.* Mazz.]干燥全草(灯盏细辛)中分离得到的有效成分,药理学研究表明,这种成分有抗脑缺血、脑缺血再灌注神经损伤及视神经保护作用[4-6],由于咖啡酸分子中含有亲水性的羧基和酚羟基,亲脂性差,难以突破血脑屏障进入脑组织,不能发挥其对脑神经的保护作用。本研究合成了咖啡酸的衍生物,以增加其亲脂性;采用原代脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞共培养建立的体外血脑屏障模型来评价其脑靶向性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

BRUKER AM400核磁共振仪(德国),TMS为内标;岛津GC/MS-QP5050A气质联用仪(日本);BRUKER SOR37傅里叶红外光谱仪(德国);AutoSpec FAB-质谱仪(美国);岛津LC-10A高效液相色谱仪,SPD-10AV紫外检测器;SCL-10A系统控制器(日本);KL-512氮吹仪(北京康林科技有限责任公司);5417c高速离心机(eppendorf公司);AS10200超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);BuCHI Melting Point B-540型熔点仪(德国);超净工作台(ESCO);Thermo Formc 3111CO_2培养箱(美国);Nikon TE2000-S倒置相差显微镜(日本);AXIOSKOP2 PLUS荧光生物显微镜(德国);岛津AEG-45SM电子天平(日本);恒温水浴锅(上海医疗器械厂);贝克曼高速冷冻离心机(美国);跨膜电阻测量仪(Millicell ERS, Millipore, 美国);透射电镜(Philips EM208s);细胞培养瓶、细胞培养板、细胞筛网(Falcon)、Transwell培养池(Millipore公司),与24孔培养板配合使用;XW-80型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂)等。

咖啡酸由武汉百思图精细化工有限公司提供;D-PBS Ca/Mg free(Gibco,21600-010)、Pen-Strep(链霉素,华北制药)、DMEM(high glucose)(Gibco, 12100-046)、Gluta MAX-1、FBS(FUMENG, FMG-0)、HEPES(Amresco,分装)、Collagenase Ⅱ(Ⅱ型胶原酶, Gibco, 17101-015)、bFGF(Gibco, 13256-029)、ECGS(Roche,11033484-001)、BSA(Roche,分装)、Percoll细胞分离液(Pharmacia,分装)、0.25% Typsin(胰酶,Gibco,15050-065)、明胶(Sigma,G-1890);无水甲醇、无水乙醇、磷酸、乙酸酐、浓硫酸、乙酸乙酯、碳酸钙、碳酸氢钠等(均为分析纯,重庆川东化工有限公司化学试剂厂)。

1.2 咖啡酸甲酯的合成[7]

称取5.40 g咖啡酸,置于250 ml圆底烧瓶中,加无水甲醇80 ml溶解,加入0.5 ml浓硫酸和9.00 g无水硫酸钠,在65 ℃下搅拌回流6 h,冷却至室温,加入1.20 g碳酸钙中和硫酸,减压除去甲醇。残留物用乙酸乙酯溶解,过滤,用2.5%碳酸氢钠溶液洗涤3次,弃水层,减压除去溶剂,残留物用甲醇重结晶,得到白色结晶4.77 g,收率80.72%。m. p. 163.8 ~ 166.0 ℃;MS(m/z):194[M^+]、163、145、135、134、117、89、77;^{1}HNMR(400 MHz,DMSO-d_6)(δ_{ppm}:7.48(1H, d, J = 15.9 Hz, H-7)、7.05(1H, d, J = 2.0 Hz,H-2)、7.00(1H, dd, J_1 = 2.0,J_2 = 8.1 Hz, H-6)、6.67(1H,d, J = 8.1 Hz, H-5)、6.26(1H, d, J = 15.9 Hz, H-8)、3.69(3H, s, OCH_3);IR(KBr) cm^{-1}:3 477(ν_{OH})、1 674(ν_{OH})、1 720($\nu_{C=O}$)、1 607(ν共轭$_{C=C}$)、1 445($\nu_{C=C}$Ar)、1 281(ν_{C-H})、1 242(ν_{C-O-C});UV:λ_{max}(methanol) 219.7、242.0、326.2 nm;纯度检测:采用HPLC法。条件:C18柱、柱温30 ℃、流速1 ml/min、波长330 nm、流动相:甲醇-0.4%甲酸(1∶1)。用归一法测得咖啡酸甲酯纯度为99.16%。

1.3 咖啡酸乙酯的合成[7]

称取5.40 g咖啡酸,置于250 ml圆底烧瓶中,加80 ml无水乙醇,待溶解后,加入0.5 ml浓硫酸和9.00 g无水硫酸钠,在80 ℃搅拌回流6.5 h,冷却至室温,加入1.20 g碳酸钙中和硫酸,减压除去乙醇。残留物用乙酸乙酯溶解,过滤,用2.5%碳酸氢钠溶液洗涤3次,弃水层,减压除去溶剂,残留物用乙醇重结晶,得到白色结晶3.35 g,收率53.67%。mp 152.8 ~ 155 ℃;MS(m/z):208[M^+]、163、145、135、134、117、89;^{1}HNMR(400 MHz,DMSO-d_6)(δ_{ppm}:7.47(1H, d, J = 15.9 Hz, H-7)、7.04(1H, d, J = 2.0 Hz,H-2)、7.00(1H, dd, J_1 = 2.0,J_2 = 8.1 Hz,H-6)、6.76(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5)、6.25(1H, d, J = 15.9 Hz,H-8)、4.15(2H, q, CH_3)、1.24(3H, t, $-CH_2-CH_3$);IR(KBr) cm^{-1}:3 435(ν_{OH})、1 659(ν_{OH})、1 600(ν共轭$_{C=C}$)、1 452($\nu_{C=C}$ Ar)、1 281(ν_{C-H});UV:λ_{max}(methanol) 220.8、242.0、326.2 nm。纯度检测:采用HPLC法。条件:C18柱、柱温30 ℃、流速1 ml/min、波长330 nm、流动相:甲醇-0.4 %甲酸(1∶1)。用归一法测得咖啡酸乙酯纯度为99.02 %。

1.4 3,4-二乙酰基咖啡酸的合成[8]

称取3.60 g咖啡酸,置于250 ml圆底烧瓶中,加20 ml乙酸酐和0.5 ml浓磷酸,于120 ℃搅拌回流1h,反应停止后,将反应物倒入冰水中,用3 × 100 ml乙酸乙酯萃取,水洗涤至中性,减压除去乙酸乙酯,残留物用乙醇重结晶,得到白色结晶4.30 g,收率81.49%。m. p. 205.0 ~ 208.2 ℃;MS(m/z):264[M^+]、222、180、134、77;^{1}HNMR(400 MHz, DMSO-d_6)(δ_{ppm}:7.663(1H, d, J = 1.6 Hz,H-2)、7.632(1H, dd, J = 8.4, 1.6 Hz, H-6)、7.312(1H, d, J = 8.4 Hz, H-5)、7.575(1H, d, J = 16.0 Hz, H-7)、6.536(1H, d, J = 16.0 Hz, H-8)、2.289(3H, s, 4-$COCH_3$ or 3-$COCH_3$)、2.283(3H, s, 3-$COCH_3$ or 4-$COCH_3$);IR(KBr) cm^{-1}:1767(ν乙酰$_{C=O}$)、1690(ν羧酸$_{C=O}$)、1433($\nu_{C=C}$ Ar)、1116(ν芳环$_{C-O-C}$);UV:λ_{max}(methanol) 220.8、275.1 nm。纯度检测:采用HPLC法。条件:C18柱、柱温30 ℃、流速1 ml/min、波长260 nm、流动相:甲醇-0.4% 甲酸(1∶1)。用归一法测得3,4-二乙酰基咖啡酸纯度为99.10%。

1.5 咖啡酸及其衍生物分配系数的测定[9]

在25 ℃将正辛醇与磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)相互饱和,用磷酸盐缓冲溶液饱和过的正辛醇配制咖啡酸甲酯、咖啡酸乙酯和3,4-二乙酰基咖啡酸溶液(500 ~ 5 000 μg/ml),用正辛醇饱和过的磷酸盐缓冲溶液配制咖啡酸溶液(500 ~ 5 000 μg/ml)。取上述各溶液10 ml加入正辛醇饱和过的磷酸盐缓冲溶液10 ml,或磷酸盐缓冲溶液饱和过的正辛醇10 ml,混合5 h,离心10 min(3 600 r/min)用HPLC法分别测定两相的药物浓度,以公式P = Coct/C水 计算其分配系数(P)。

1.6 体外 BBB 模型的建立[10-13]

1.6.1 BMVEC 的分离和原代培养　10 只 5～7 d 龄 SD 大鼠,颈椎脱臼处死后浸泡于碘伏中消毒后打开颅腔,取出全脑,取大脑皮质用缓冲液漂洗 3 次后剪碎成 1 mm^3 大小,加入 0.1% Collagenase II 溶液混匀后 37 ℃水浴消化 1 h,离心,去上清液,加入 25% BSA 溶液悬浮混匀后低温离心,底部沉淀加入 2 ml 0.1% Collagenase Ⅱ溶液悬浮混匀后 37 ℃水浴消化 30 min,离心,去上清液,加入 2 ml DMEM 培养液悬浮后铺于经离心形成连续梯度的 12 ml 50% Percoll(25 000 × g, 60 min, 4 ℃),离心(1 000 × g,10 min,4 ℃),吸出距离梯度液液面 4/5 处的红细胞层之上白黄色的层面用 DMEM 漂洗 2 次(离心 600 × g, 5 min,室温),去上清液,加入 BMVEC 培养液悬浮后接种于涂布 1% 明胶的 35 mm 培养皿,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内静置培养,12 h 后换液,随后隔天换液。

1.6.2 AC 的分离和原代培养　10 只新生 2～3 d SD 大鼠,按 BMVEC 原代培养同样操作取两侧大脑皮层组织剪碎。在 37 ℃条件下加入适量 0.25% Typsin 消化 20 min,加入含 10% FBS 的培养液终止消化,并用巴氏吸管轻轻吹打至乳浊状,离心(600 × g, 5 min,室温),弃上清液,重新加入上述培养基,吹打,调整细胞密度为 1.5×10^5 个/ml 初细胞悬液,并将其接种至培养瓶中,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 40 min,翻转培养瓶再一次孵育 40 min,吸出瓶中的细胞悬液,用 75 μm 孔径的细胞筛网过滤,将滤液离心(600 × g, 10 min,室温)加入 AC 培养液接种至培养瓶中,将培养瓶置于 CO_2 培养箱中培养 3～5 h,再补加足量的培养液,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 9 d(每 3 天更换培养液 1 次),第 9 天将培养瓶置于恒温旋转摇床上振摇(240 r/min,18 h,37 ℃),去掉悬浮的细胞,用 D-PBS 液清洗 3 次,进行传代培养。

1.6.3 BMVEC/AC 共培养　首先以 1% 明胶包被细胞培养池的聚碳酸酯微孔膜,再将细胞培养池放入到细胞培养板的培养孔中,将 AC 以 $5 \times 10^5/cm^2$ 的密度接种于聚碳酸酯膜下表面,4 h 后将 Transwell 正置于培养板中,加入培养基。2～3 d 换液 1 次,培养 5 d 后,BMVEC $2.5 \times 10^5/cm^2$ 的密度接种于聚碳酸酯膜的上面,隔天换液,5～7 d 后内皮细胞生长到达融合。通过 Millicell ERS, Millipore 跨膜电阻测定仪测定共培养模型的跨膜电阻值大于 300 Ω · cm^2。

该共培养模型的特点是,培养池的内部作为供给池,模拟血管的腔面侧;外部为接收池,模拟血管腔外基膜侧,细胞模型能够将这两个室分开。在培养池膜的上表面可形成一层均匀的 BMVEC 单层;膜的下表面 AC 的突起可穿过膜孔与 BMVEC 相接触,以模拟体内 BBB 环境。

1.6.4 大鼠 BMVEC 免疫荧光鉴定　取传代 3～4 次后所获细胞,制成细胞悬液,接种至置有盖玻片的 24 孔培养板,放入培养箱培养 24 h,使细胞贴壁。荧光显微镜下观察内皮细胞染色情况,TRITC 阳性者呈红色荧光,即为 BMVEC 细胞。随机选取 5 个不同视野,计数阳性细胞(荧光镜下)占所有细胞(光镜下)的比例。

1.6.5 大鼠 AC 免疫荧光检测　方法同 1.6.4, FITC 阳性者呈黄绿色为 AC 细胞。

1.7 咖啡酸及其衍生物透过体外 BBB 的研究

1.7.1 样品制备　参考文献[14]的方法,选择试漏实验阳性的孔进行通透性实验,向供池中加入一定浓度的咖啡酸、咖啡酸甲酯、咖啡酸乙酯、3,4-二乙酰基咖啡酸各 300 μl,受池中加 600 μl AC 培养液。在 48 min 分别从受池中小心收集滤液各 100 μl、50 μl 于 -20 ℃保存,待所有取样结束后做样品处理。其中 0 小时为空白对照,向供池内加入的药液为供池的起始浓度。将各样品氮气吹干(37 ℃),分别向其中加入甲醇,超声处理 20 min, 5 000 r/min,离心 10 min,取上清液,作 HPLC 分析供试品溶液。

1.7.2 样品 HPLC 分析条件　色谱条件:依利特 SinoChrom ODS-BP(250 mm × 4.6 mm,5 μmol/L) 柱号:E1817666,流速:1.0 ml/min;柱温:室温;流动相:咖啡酸:乙腈-0.6% 甲酸(26∶74),咖啡酸乙酯、3,4-二乙酰基咖啡酸:乙腈-0.5% 甲酸(35∶65),咖啡酸甲酯:乙腈-0.6% 甲酸(30∶70);检测波长为 325 nm。分别精密吸取 20 μl 供试品溶液注入高效液相色谱仪,进行检测。

1.7.3 咖啡酸及其衍生物体外 BBB 透过率　根据 HPLC 测定结果,取以下公式计算透过率:

$$P_{药物} = \frac{C_{受池} \times V_{受池}}{C_{供池} \times V_{供池}} \times 100\%$$

其中 $C_{受池}$ 为受池样品的峰面积,$C_{供池}$ 为供池峰面积,$V_{受池}$ 为受池体积,$V_{供池}$ 为供池体积。

2 结果

2.1 分配系数的测定结果

咖啡酸、咖啡酸甲酯、咖啡酸乙酯和 3,4-二乙酰基咖啡酸的分配系数结果见表 1。咖啡酸酯化和乙酰化后,其分配系数提高了 103～104 倍。经结构修饰后,所得化合物的亲脂性均增强。

表 1　咖啡酸及其衍生物的分配系数(n = 3)

化合物	POct/水	LogP
咖啡酸	0.036 7 ± 0.003 1	-1.435
咖啡酸甲酯	57.134 1 ± 4.055 0	1.757
咖啡酸乙酯	239.212 0 ± 10.321 0	2.379
3,4-二乙酰基咖啡酸	60.796 1 ± 4.217 0	1.784

2.2 建立的体外 BBB 共培养模型及鉴定结果

2.2.1 BMVEC 免疫荧光鉴定　Ⅷ因子相关抗原免疫荧光显微镜检测可见内皮细胞的细胞质及细胞核周围者呈红色荧光,细胞染色阳性率 >89%(图 1)。

2.2.2 AC 免疫荧光鉴定　胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是星形胶质细饱特有的蛋白,用 DAB 显色 GFAP 抗体标的星形胶质细胞,绿色荧光信号为阳性反应。GFAP 主要位于星形胶质细胞的细胞质和突起内,GFAP 染色阳性的细胞形态不规则,突起粗大。细胞染色阳性率 >92%(图 2)。

2.2.3 BMVEC/AC 共培养 BBB 模型的透射电镜观察　AC 在接种于聚碳酸酯多孔膜后 4～5 d 达到融合状态。BMVEC 在接种于聚酯膜后 5～7 d,细胞达到融合状态。透射电镜观察可见膜下面的 AC 的突起穿过膜孔与 BMVEC 相接触,PET 膜上面的 BMVEC 形成紧密连接(图 3)。

2.2.4 试漏实验　显微镜下观察 BMVEC 达汇合状态后,采用试漏实验初步判断血脑屏障是否形成。将细胞培养基加入到插入器内的供池内,使细胞插入器供池与受池的液面差 >0.5 cm。在 4 h 后插入器两池间仍能保持明显的液面差,说明 BMVEC 已经完全汇合,BBB 基本形成。

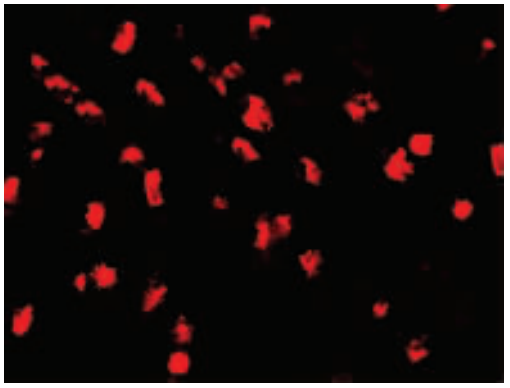


图1 BMVEC Ⅷ因子抗原荧光显微镜观察 （×200）

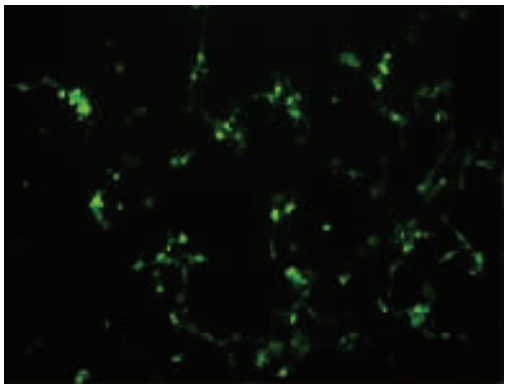
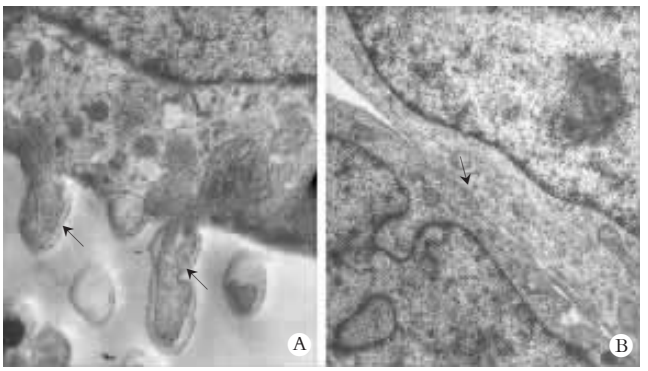


图2 星形胶质细胞的荧光显微镜观察 （×40）



A:AC 突起穿过膜孔（×17 000）;B:BMVEC 的紧密连接（×12 000）

图3 BMVEC/AC 共培养模型的透射电镜观察

2.3 咖啡酸及其衍生物体外 BBB 透过率

计算结果见表2。从表2结果可知,咖啡酸和咖啡酸乙酯不能透过体外 BBB,而咖啡酸甲酯和3,4-二乙酰基咖啡酸可透过体外 BBB,具一定的脑靶向性。

表2 咖啡酸及其衍生物透过体外 BBB 的透过情况

化合物	$C_{供池}$ (mg/ml)	$V_{供池}$ (μl)	8h $C_{受池}$ (mg/ml)	$V_{受池}$ (μl)	透过率 (%)
咖啡酸	0.100 0	300	–	600	0
咖啡酸甲酯	0.200 0	300	0.027 00	600	27.00
咖啡酸乙酯	0.200 0	300	–	600	0
3,4-二乙酰基咖啡酸	0.200 0	300	0.028 00	600	28.00

“–”表示未能检测出来

3 讨论

参考文献[7]的方法,以咖啡酸为原料进行酯化,所得咖啡酸甲酯、咖啡酸乙酯收率低、产品难以纯化。通过对文献方法的改进,对催化剂用量、反应时间、除水及纯化过程中改用 $NaHCO_3$ 等条件的调整,咖啡酸甲酯、咖啡酸乙酯收率得分别达到80.72%和53.67%。

分配系数的测定结果表明,咖啡酸经结构修饰后,其衍生物的亲脂性大幅度增加,达到了课题设计要求。

在 BMVEC 的培养时,采用5~7日龄哺乳期的 SD 大鼠作为培养材料,脑组织剪碎后,用0.1% Collagenase Ⅱ溶液消化,消化效果好,对细胞损伤较小,并且可获得足够的微血管内皮细胞。在分离大血管和神经组织时,文献[15]中使用15% Dextran,我们使用的25% BSA,分离效果较好;在原代 AC 培养过程中,根据成纤维细胞和胶质细胞贴壁速度不同,采用两次差速黏附,去除成纤维细胞。由于星形胶质细胞的增殖速度远大于少突胶质细胞和其他神经细胞,在第9~12天星形胶质细胞与其他细胞分层生长,星形胶质细胞在底层,采用恒温摇床振摇18 h,去除上层的小胶质细胞和其他神经细胞;BMVEC/AC 共培养共培养主要是在 Transwell 底部的聚碳酸酯微孔膜上接种同种属动物来源的 BMVEC 和 AC,在培养池膜的上表面形成一层均匀的 BMVEC 单层;膜的下表面 AC 的突起可穿过膜孔与 BMVEC 相接触,以模拟体内 BBB 环境。

透过体外 BBB 的研究结果表明,咖啡酸因其分子中均含有羧基、酚羟基,分子中极性基团高度集中,水溶性强,脂溶性差,不能透过 BBB 进入中枢神经系统,因而不能发挥其对脑神经的保护作用。根据前药原理,对羧基进行酯化、对酚羟基进行酰化增加其脂溶性,以期 BBB 达到脑靶向给药的目的。经结构修饰的3个衍生物中有2个:咖啡酸甲酯、3,4-二乙酰基咖啡酸具有一定的脑靶向性;咖啡酸乙酯不能透过 BBB,其原因有待进一步研究。

参考文献:

[1] 邓孔昭, 黄如训. 血脑屏障[M]. 北京:人民卫生出版社, 1984: 6–10.

[2] 李振. 恶性肿瘤的化学治疗与免疫治疗[M]. 北京:人民卫生出版社, 1984: 6–10.

[3] van-Bree J B, de-Boer A G, Danhof M, *et al*. Characterization of an "*in vitro*" blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1988, 247(3): 1233–1239.

[4] 刘红. 灯盏花注射液抗脑缺血作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2001, 18(2): 96–98.

[5] 李玲,杨为民,吴婉玲, 等. 灯盏花总黄酮对沙土鼠短暂性脑缺血

再灌注损伤的神经保护作用[J]. 天然药物研究与开发,2000, 12(5): 55 - 59.
[6] 张静,杨文宇,张艺, 等. 灯盏细辛化学成分及视神经保护活性成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22): 1695 - 1697.
[7] 李东明,吕彤,陈晶, 等. 合成阿魏酸乙酯方法的研究[J]. 当代化工, 2005, 34(5): 318 - 320, 340.
[8] 邓梅,吴振刚,刘雪英, 等. 红景天苷及其类似物的合成 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(16): 1501 - 1502.
[9] 刘文胜,罗维早,张志荣. N1-羧酰-5-氟尿嘧啶系列前体药物的体外降解动力学研究[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(9): 434 - 439.
[10] 许熊飞,李润平,李泉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 84 - 88.
[11] Gordon E L, Danielsson P E, Nguyen T S, *et al*. A comparison of primary cultures of rat cerebral microvascular endothelial cells to rat aortic endothelial cells[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol, 1991, 27A(4): 312 - 326.
[12] Kido Y, Tamai I, Nakanishi T, *et al*. Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2002, 17(1):34 - 41.
[13] Jeliazkova-Mecheva V V, Bobilya D J. A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2003, 12(2): 91 - 98.
[14] 高永红,王永炎,肖盛元, 等. 清开灵有效组分透过体外模拟血脑屏障的研究[J]. 北京中医药大学学报,2005, 28(2): 26 - 28.
[15] 张艺,盛艳梅,孟宪丽, 等. 中药钙拮抗作用与视神经保护的相关性研究[J]. 世界科学技术中医药现代化, 2005, 7(4): 23 - 27.

(**收稿**:2009-06-30;**修回**:2009-10-21)
(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2010)03-0237-01

个案与短篇

左旋多巴诱导舞蹈样运动障碍 3 例

蒋国会,王子军,周晓丽,刘万尧 (408000 重庆 涪陵,重庆市涪陵中心医院神经内科)

[关键词] 运动障碍,药物性;左旋多巴
[中图法分类号] R742.2 **[文献标志码]** B

左旋多巴(L-dopa)是目前治疗帕金森病(parkinson disease,PD)最有效的药物,但是长期服用 L-dopa(5 ~ 12 年)后会出现一些严重的并发症,主要有症状波动、运动障碍和精神障碍等,其中表现为舞蹈症样的运动障碍是 L-dopa 诱导的异动症(levodopa-induced dyskinesias,LID)的一种,临床上较少见,但该症的出现给 PD 患者带来极大的痛苦。目前由于 LID 的发病机制尚未明确,所以其治疗存在困难[1]。本研究报告 3 例 PD 患者 L-dopa 不同治疗阶段出现的 LID,并对其治疗方法及疗效进行分析。

1 临床资料

病例 1:患者,男性,62 岁。患 PD 5 年,服用美多巴(苄丝肼-左旋多巴 50 ~ 200 mg/片)每次 1 片,每日 3 次;安坦 2 mg,每日 3 次。因手足徐动 1 个月入院。入院检查:血压 160/100 mmHg,神清语利,心肺腹部检查未见异常,四肢肌张力低,余神经系统未见阳性定位体征。生化、常规检查,头颅 CT、心电图、脑电图、胸片检查无异常发现。入院后停用美多巴和安坦,改用息宁控释片(卡比多巴-左旋多巴,50 ~ 200 mg/片)1 片,每日 3 次;泰舒达 50 mg,每日 3 次;1 周后手足徐动好转出院,随访 3 个月无复发。

病例 2:患者,女性,82 岁。患 PD 14 年,长期服用美多巴,每次 1 片,每日 4 次;泰舒达每次 1 片,每日 4 次。出现头部及四肢不自主运动 1 年余,表现为头部及四肢舞蹈样动作,肌张力低,不因睡眠而终止,导致入睡少,并有进食困难。不自主运动发病之初,美多巴改为息宁控释片 1 片,每日 3 次,舞蹈样症状明显缓解,但仍有发作。半年后加重,每次服药后 30 ~ 60 min 症状有缓解,约 3 h 后再加重,因此患者自加美多巴 1 片(2 个月后加至 2 片),每日 3 次,与息宁控释片交替服用,白天 3 h 服药 1 次。加剂初症状有改善,约半年后加重,用药基本对舞蹈样不自主运动无作用而入院。考虑 L-dopa 超量而停用美多巴,继续息宁控释片 1 片,每日 3 次;泰舒达 50 mg,每日 3 次;1 周后症状无变化,加用氯氮平 25 mg,早、晚各 1 次,症状明显缓解;氯氮平用 1 周后改为 50 mg,早、晚各 1 次,随访 3 个月,患者症状控制较好,有轻微不自主运动,但不影响进食、入厕及睡眠等日常活动。

病例 3:患者,女性,66 岁。患 PD 8 年,不规律服用美多巴,间断服用 1 片,每日 4 次;出现头部及四肢不自主运动 5 年,双手及头部呈弹钢琴或演奏指挥样抖动,抖动频率较慢。发病时神清,可应答,持续时间数十分钟至 3 h,期间可有短暂间歇。发病与服用美多巴无明显时间相关性,停药期间症状似乎较重。患者因走动时摔伤致右股骨粉碎性骨折而住骨科治疗,因患者四肢抖动频繁,动作粗大,导致手术困难,给予卧床皮牵引。神经系统检查除头部及四肢不自主抽动、四肢肌张力高外未见其他阳性体征。入院后给予氯硝西泮、巴氯芬(氯苯氨丁酸)、氟哌啶醇、苯巴比妥等药治疗 1 周无效。神经内科会诊停用美多巴,给予息宁控释片 1 片,每日 3 次;泰舒达 50 mg,每日 3 次;安坦 1 mg,每日 3 次;氯氮平 25 mg,早、晚各 1 次,症状明显缓解;氯氮平用 1 周后改为氯氮平 50 mg,早、晚各 1 次;安坦改为 2 mg,每日 3 次;随访 3 个月,患者症状控制好,无明显不自主运动。

(下转 245 页)

[通信作者] 蒋国会,电话:(023)72226805,E-mail: jiangguohuisn@163.com