

神经疾病发病机制研究

DOI: 10.11699/cyxb20130604

雷沙吉兰对小鼠肝和脑组织中单胺氧化酶活性的影响

彭 杨, 张万萍, 程 鹏, 曾庆东, 李文军, 鲁振浩, 余 瑜

(重庆医科大学药学院药物化学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:考察腹腔注射雷沙吉兰对小鼠中肝和脑单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)活性的抑制作用。**方法:**采用紫外分光光度法, 分别测定低温差速离心法提取小鼠肝和脑组织中的 MAO-A 和 MAO-B 活性。**结果:**雷沙吉兰对 MAO-B 活性的抑制作用明显强于 MAO-A 活性; 在脑中抑制作用显著比在肝脏中强。**结论:**雷沙吉兰对小鼠脑内 MAO-B 活性具有较高的选择性抑制作用。

【关键词】雷沙吉兰; 单胺氧化酶; 小鼠; 酶活性; 抑制作用

【中国图书分类法分类号】R394.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-24

Effects of rasagiline on monoamine oxidase in mouse liver and brain tissues

PENG Yang, ZHANG Wanping, CHENG Peng, ZENG Qingdong, LI Wenjun, LU Zhenhao, YU Yu

(Teaching and Research Section of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the inhibition of rasagiline on monoamine oxidase (MAO) in mouse liver and brain tissues.

Methods: After being extracted by differential centrifugation, activities of MAO-A and MAO-B in mouse liver and brain tissues were determined by UV spectrophotometry respectively. **Results:** Inhibition effect of rasagiline was stronger on MAO-B than on MAO-A and inhibition effect of rasagiline was stronger in the brain than in the liver. **Conclusion:** Rasagiline exerts selective inhibition effects on MAO-B in mouse liver and brain tissues.

【Key words】rasagiline; monoamine oxidase; mouse; enzyme activity; inhibition effect

单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)是一种主要存在于神经元和神经胶质的黄素蛋白, 能够选择性催化代谢生物胺和神经递质^[1], 可分为 MAO-A 和 MAO-B, 这 2 种亚型结构具有 70% 氨基酸序列的相似性^[2]。其中, MAO-B 主要分布在神经胶质细胞和组胺能神经元中, 负责中枢神经系统内多巴胺(dopamine, DA)的代谢, 其抑制剂能阻止脑内 DA 的代谢, 提高其水平, 缓解帕金森病(Parkinson's disease, PD)的症状。雷沙吉兰作为第 2 代不可逆的 MAO-B 抑制药物^[3], 能有效抑制 MAO-B 活性, 延长 DA 在脑内的停留时间, 同时阻止过氧化氢的产生, 缓解氧化应激, 减少 DA 能神经元的损伤和凋亡。Ivanovic^[4]采用紫外分光光度法, 测定人体中血小板

MAO 活性。Youdim 和 Tipton^[5]采用同位素标记法, 测定了雷沙吉兰对小鼠肝和脑内 MAO 的活性, 此方法有样品处理繁琐、成本较高以及存在环境污染等问题。为此, 本文拟采用紫外分光光度法, 测定低温差速法提取肝和脑组织中 MAO 的活性, 考察小鼠腹腔注射雷沙吉兰的给药剂量、时间以及次数等因素对 MAO 活性的影响。

1 材料与试剂

1.1 实验动物

昆明小鼠 178 只, 每只 20 g 左右, 由重庆医科大学实验动物中心提供[证号: SCXK(渝)2012-0001; SYXK(渝)2012-0001]。

1.2 仪器与试剂

YJ-1450 型超净台(苏州净化设备厂); HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华公司); H-1750 R 高速低温离心机(湖南湘仪公司); AR 2140 电子天平(上海力衡公司); UV-2102 PCS 紫

作者介绍: 彭 杨, Email: pengyang328@126.com,

研究方向: 新药筛选及活性研究。

通信作者: 余 瑜, Email: yuyu3519@163.com。

基金项目: 国家科技重大专项课题“重大新药创制”资助项目(编号: 2010ZX09401-306-1-1)。

外可见分光光度计(上海仪器公司);KQ 2200 B 型超声波清洗器(昆山超声仪器公司);FSH-2 A 型可调高速匀浆机(金坛华天仪器厂)。

雷沙吉兰(重庆医药工业研究院有限责任公司馈赠)、蔗糖、苄胺、5-羟色胺肌酐酐单水合硫酸盐、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、高氯酸、氯化钠、乙酸丁酯、环己烷等均为分析纯试剂,实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 磷酸钾缓冲液的配制 准确称取 KH_2PO_4 1.86 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 19.70 g,溶于超纯水中,定容至 1 000 ml,即得 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.6),于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.1.2 蔗糖溶液的配制 准确称取蔗糖 51.34 g,溶于超纯水中,定容至 500 ml,即得 300 mmol/L 蔗糖溶液,于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.1.3 雷沙吉兰储备液的配制 精密称取雷沙吉兰,溶于灭菌注射用水,定容,即得 1 mmol/L 雷沙吉兰储备液,备用。

2.2 MAO 的制备

将小鼠处死后,于超净台中迅速取出脑,用 0.9% 生理盐水洗涤 3 次,拭干,于 -80 °C 下保存,备用。取脑组织以 (1 g: 35 ml) 的比例在 300 mmol/L 蔗糖溶液中匀浆,将肝匀浆置于高速低温冷冻离心机中以 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液用 10 000 r/min 离心 30 min,弃去上清液,取沉淀混悬于 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.6)中,再以 10 000 r/min 离心 30 min,弃去上清液,所得的沉淀为 MAO,再按 (1 g: 8 ml) 比例加入 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.6)使沉淀混悬,分装成每支 EP 管 1.2 ml,于 -80 °C 储存,备用。

同 2.2 项方法,可制得肝的 MAO。

2.3 MAO 活性的测定

以苄胺作为 MAO-B 的底物,用环己烷提取,在 242 nm 波长下测定吸光度。同 2.3 项方法,以 5-HT 作为的底物,用乙酸丁酯提取,在 280 nm 波长处测定吸光度。

2.4 雷沙吉兰对小鼠肝和脑组织中 MAO 活性的影响

2.4.1 不同剂量对 MAO 活性的影响 选取昆明小鼠 54 只,随机分成 9 组,每组 6 只,雄雌各半。第 1 组为空白对照组,第 2~9 组为给药组,其药物剂量分别为 0.01、0.10、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00 mg/kg。采取腹腔注射给药,给药 2 h 后处死小鼠,于灭菌超净台中取出肝和脑,按 2.2 项和 2.3 项操作,测定其活性,其结果(图 1)显示,雷沙吉兰对 MAO 的抑制作用呈一定的量效关系,并且对 MAO-B 具有显著的选择性抑制作用。

2.4.2 给药后不同时间对 MAO 活性的影响 选取昆明小鼠 54 只,随机分成 9 组,每组 6 只,雄雌各半。第 1 组为空白对

照组,第 2~9 组为给药组(给药剂量为 10 mg/kg),腹腔注射给药后,第 2~9 组分别于 0.5、1、2、4、16、24、48、72 h 后处死小鼠,按 2.2 项和 2.3 项操作,测定其活性,其结果(图 2)显示,给药后 0.5 h 时小鼠肝和脑 MAO 的活性被抑制,在 16 h 时其活性抑制仍然明显,雷沙吉兰对 MAO-B 的抑制作用明显高于 MAO-A,在 24 h 后,肝中 MAO-A 活较快恢复,72 h 时,肝中 MAO-A 的活性基本完全恢复,而脑中 MAO-B 仍有强烈的抑制作用。

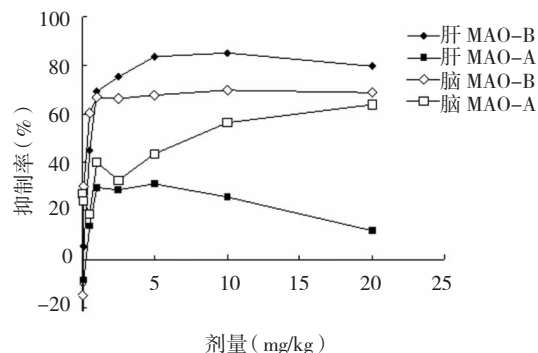


图 1 不同剂量雷沙吉兰对小鼠肝和脑 MAO 的抑制率

Fig.1 Inhibition rate of different dosages of rasagiline on mouse liver and brain MAO

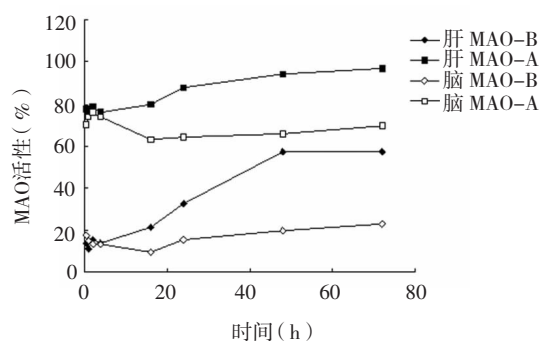


图 2 给药后不同时间雷沙吉兰对小鼠肝和脑 MAO 活性的影响

Fig.2 Effect of rasagiline on mouse liver and brain at different time points after administration

2.4.3 给药次数对 MAO 活性的影响 选取昆明小鼠 70 只,随机分成 7 组,每组 10 只。第 1 组为空白对照组,第 2~7 组为给药组,其药物剂量分别为 0.010、0.025、0.075、0.100、0.500、1.000 mg/kg,每天给药 1 次,每组分 3 批分别于 1、2 周和 3 周处死小鼠,最后一次给药 24 h 后处死小鼠。按 2.2 项和 2.3 项操作,测定其活性。其结果(图 3 和图 4)显示,雷沙吉兰对脑中 MAO-B 的抑制作用明显强于 MAO-A;对 MAO 的抑制作用呈现一定的量效关系;连续给药 2 周比给药 1 周的 MAO 抑制作用更强。当剂量为 0.01 mg/kg 时雷沙吉兰对小鼠脑中 MAO 就有较强的抑制作用,而对肝中 MAO 给药剂量达到 0.10 mg/kg 时才有一定的抑制作用。

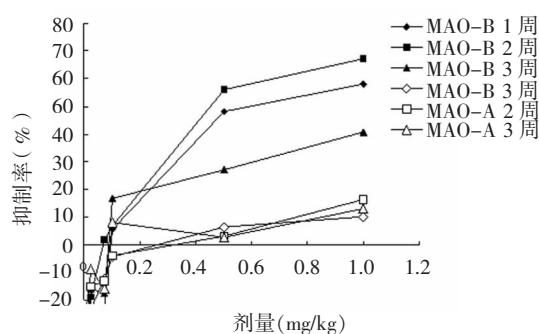


图 3 不同给药次数雷沙吉兰对小鼠肝脏 MAO 活性的抑制率

Fig.3 Inhibition rate of rasagiline on mouse liver MAO after different times of administration

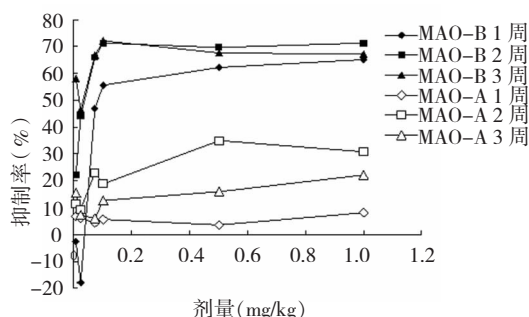


图 4 不同给药次数雷沙吉兰对小鼠脑 MAO 活性的抑制率

Fig.4 Inhibition rate of rasagiline on mouse brain MAO after different times of administration

3 讨论

PD 是一种常见的神经退行性变疾病,临床主要表现为静止性震颤、肌肉强直、运动迟缓和姿态异常等。到目前为止,对神经退行性变的病理学原因尚未十分清楚,但有证据表明受损线粒体却改变了细胞内的氧化还原状态,引起了泛素蛋白酶体途径的功能障碍与细胞凋亡^[6],其典型的特点是黑质纹状体 DA 的缺失。MAO-B 作为 DA 体内代谢的重要酶,其抑制剂能抑制 MAO-B,阻止脑内 DA 的代谢,提高其水平。为此,MAO-B 抑制药物成为治疗 PD 的有效方法之一。

雷沙吉兰作为第二代不可逆的 MAO-B 抑制药物,单独使用可作为 PD 早期治疗的一线用药,还可与 L-左旋多巴联合用药治疗中度和重度的 PD。与其他抗 PD 药物不同的是,雷沙吉兰在提高 DA 水平的同时,还具有保护 DA 能神经元的作用。目前认为雷沙吉兰的神经保护作用机制归纳起来主要有 3 种^[7-9]:一是稳定线粒体的膜电位;二是诱导抗凋亡

基因的表达;三是调节淀粉样前蛋白的酶解加工过程。另外,雷沙吉兰的代谢产物是一种无活性的非苯丙胺物质,其副作用小。经 Jack 和 Vuong^[10]考察雷沙吉兰对人体 MAO 活性的影响以及进行的药代动力学、临床疗效和安全性评价,其结果表明,雷沙吉兰是一种用于治疗 PD 有效和安全的 MAO-B 抑制药物。本文实验中表明,雷沙吉兰对 MAO 的抑制作用呈一定的量效关系,并且对 MAO-B 具有显著的选择性抑制作用。以 10 mg/kg 剂量,给药后 16 h,雷沙吉兰对脑内 MAO-B 有很强的抑制作用;当以 0.01 mg/kg 剂量连续给药时,雷沙吉兰可对脑内 MAO 产生抑制作用。

综上所述,雷沙吉兰对小鼠肝和脑组织 MAO 活性都有一定的抑制作用,尤其是对脑内 MAO-B 的抑制作用非常明显,这为进一步研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Samii A, Nutt J G, Ransom B R. Parkinson's disease[J]. Lancet, 2004, 363(9423): 1783-1793.
- [2] Shih J C, Chen K, Ridd M J. Monoamine oxidase: from genes to behavior[J]. Annual Review of Neuroscience, 1999, 22(2): 197-217.
- [3] Bar-Am O, Weinreb O. The neuroprotective mechanism of 1-(R)-aminogindan, the major metabolite of the anti-parkinsonian drug rasagiline[J]. Neurochem, 2010, 112(5): 1131-1137.
- [4] Ivanovic I D. Determination of platelet monoamine oxidase by new continuous spectrophotometric method[J]. J Clin Chem Clin Biochem, 1988, 26(9): 447-451.
- [5] Youdim M B, Tipton K F. Rat striatal monoamine oxidase-B inhibition by 1-deprenyl and rasagiline: its relationship to 2-phenyl-ethylamine-induced stereotypy and parkinson's disease[J]. Parkinsonism and Related Disorders, 2002, 8(4): 247-253.
- [6] Moore D J, West A B, Dawson V L, et al. Molecular pathophysiology of parkinson's disease[J]. Annu Rev Neurosci, 2005, 28(7): 57-87.
- [7] Friberg H, Wieoch T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration[J]. Biochimie, 2002, 84(3): 241-250.
- [8] Akao Y, Maruyama W, Yi H, et al. An anti-parkinson's disease drug, N-propargyl-1-aminogindan, enhances expression of antiapoptotic bcl-2 in human dopaminergic SY-5Y cells[J]. Neurosci Lett, 2002, 326(2): 105-108.
- [9] Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, et al. Rasagiline: a novel anti-parkinsonian monoamine oxidase-B inhibitor with neuroprotective activity[J]. Progress In Neurobiology, 2010, 92(3): 330-344.
- [10] Jack J C, Vuong A L. Rasagiline: a second-generation monoamine oxidase type-B inhibitor for the treatment of parkinson's disease[J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2006, 63(10): 915-928.

(责任编辑:关蕊良)