

## · 论 著 ·

## 氟马西尼不同给药途径的催醒作用评价

侯 成, 卢光照, 张 翮, 鲁 莹, 钟延强, 邹 豪 (第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 研究氟马西尼不同给药途径对受地西洋和唑吡坦催眠小鼠的催醒作用, 评价氟马西尼口服制剂的可行性。**方法** 首先, 昆明种小鼠分别腹腔注射生理盐水和戊巴比妥钠(S+W)、地西洋和戊巴比妥钠(D+W)、唑吡坦和戊巴比妥钠(Z+W), 观察(D+W)组和(Z+W)组能否延长戊巴比妥钠睡眠时间, 验证地西洋和唑吡坦的催眠效果; 然后提前腹腔注射给药氟马西尼, 以小鼠睡眠时间为评价指标, 评价其催醒作用; 最后考察提前灌胃给药氟马西尼, 观察其睡眠时间, 评价氟马西尼灌胃给药的催醒作用。**结果** 与对照组(S+W)相比, 地西洋组(D+W)和唑吡坦组(Z+W)能显著延长戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时间( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ); 提前腹腔注射或灌胃给药氟马西尼, 与地西洋组(D+W)和唑吡坦组(Z+W)相比, 小鼠的睡眠时间显著缩短( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ )。**结论** 氟马西尼无论是腹腔注射还是灌胃给药, 均能拮抗地西洋和唑吡坦的催眠作用, 表明氟马西尼制成的口服制剂, 同样能显著发挥药效, 为研制氟马西尼口服制剂的可行性提供了依据。

**[关键词]** 氟马西尼; 地西洋; 唑吡坦; 催眠; 催醒

**[中图分类号]** R614 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)01-0030-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.006

## Evaluation of the effect of different routes of administrating flumazenil against hypnosis

HOU Cheng, LU Guangzhao, ZHANG He, LU Ying, ZHONG Yanqiang, ZOU Hao (Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of flumazenil on hypnotic mice induced by diazepam and zolpidem, and to evaluate the possibility of flumazenil oral administration. **Methods** First, Kunming mice were injected intraperitoneally with normal saline and sodium pentobarbital (S+W), diazepam and pentobarbital sodium (D+W), zolpidem and pentobarbital sodium (Z+W). The hypnotic effect of diazepam and zolpidem on prolonging the sleep time of pentobarbital sodium would be verified by (D+W) group and (Z+W) group. Then the mice were injected intraperitoneally with flumazenil. The sleep time was used as the evaluation index to evaluate the effect of flumazenil against hypnosis. Finally, the oral administration of flumazenil was observed against hypnosis, which was evaluated by using sleep time as an index. **Results** Compared with the control group (S+W), the diazepam group (D+W) and the zolpidem group (Z+W) significantly prolonged the sleep time induced by pentobarbital sodium ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ); After intraperitoneal injection of flumazenil, compared with the diazepam group (D+W) and the zolpidem group (Z+W), the sleep time of the diazepam group [F(ip)+D+W] and the zolpidem group [F(ip)+Z+W] were significantly shorter ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ); After oral administration of flumazenil, the sleep time of the diazepam group [F(ig)+D+W] and the zolpidem group [F(ig)+Z+W] were also significantly shorter ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Flumazenil, whether intraperitoneal injection or intragastric administration, could antagonize the hypnotic effect of diazepam and zolpidem. It was proved that oral administration of flumazenil had the same effect compared with intraperitoneal injection of flumazenil, which provided the possibility of preparation of oral administration of flumazenil.

**[Key words]** flumazenil; diazepam; zolpidem; hypnosis; against hypnosis

虽然镇静催眠药短期治疗有效, 但若长期使用,

常伴有后遗效应、依赖性、反跳性失眠等不良反应<sup>[1]</sup>。氟马西尼, 化学名称为 8-氟-5, 6-二氢-5-甲基-6-氧代-4H-咪唑并[1, 5-a][1, 4]苯并二氮-3-羧酸乙酯, 能够高效结合中枢苯二氮(BDZ)受体, 竞争性抑制  $\gamma$ -氨基丁酸-苯二氮复合物(GABA-BDZ)识别 BDZ 受体药物, 进而减少  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的释放, 逆转 GABA 释放带来的中枢抑制

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30801441, 81773278); 军队后勤科研重大项目(AWS14J011)

**[作者简介]** 侯 成, 硕士研究生, Email: 878473040@qq.com

**[通讯作者]** 邹 豪, 博士, 副教授, 研究方向: 创新药物制剂研究, Tel: (021) 81871287, Email: haozou@smmu.edu.cn

作用,在临床上主要应用于拮抗 BDZ 受体激动产生的各类症状<sup>[2]</sup>。目前临床应用的氟马西尼剂型主要是注射剂,但随着科研工作地开展,为满足不同病理因素的需要,找寻更多的给药途径已经成为研究热点<sup>[3]</sup>。

氟马西尼作为 BDZ 拮抗剂,主要用于拮抗 BDZ 受体激动剂的作用,而地西洋和唑吡坦是 BDZ 受体激动剂的代表药物。地西洋<sup>[4]</sup>作为 BDZ 受体的代表药物,能特异性地结合中枢神经的 GABA 受体,释放 GABA,产生中枢抑制作用,进而产生抗焦虑、镇静催眠、麻醉的作用。唑吡坦<sup>[5]</sup>作为非 BDZ 受体代表药物,能选择作用于 A 型  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA<sub>A</sub>),增强 GABA 的释放,从而产生中枢抑制的各类症状。上述两药常作为镇静催眠药在临床上广泛使用。

要评价氟马西尼不同给药途径对催眠作用的影响,则必须要建立一个完善的催眠模型<sup>[6]</sup>。然而长期以来,由于缺乏长时间记录活动动物脑电波的方法及解析这种脑电波的手段,在我国临床前药理学研究中,规定用能否延长或缩短戊巴比妥钠翻正反射的丢失时间来反映睡眠效应,虽然所得结果实际上是所试药物对麻醉作用的影响,不能反映其真实的睡眠效应,但是它却是一种较好的睡眠效应分析模型<sup>[7]</sup>。

《新药(西药)临床及临床前研究指导原则汇编》第 48 页规定,镇静催眠药物一般能延长戊巴比妥钠的睡眠时间<sup>[7]</sup>。翻正反射指正常生理情况下,动物四肢朝上背位放置后能迅速翻转过来的生理反射。如注射戊巴比妥钠等药物后,动物的这种特性会减弱或消失,故称为翻正反射消失。在实验中,从注射戊巴比妥钠到翻正反射消失的这段时间,一般称为睡眠潜伏期。翻正反射消失发生到恢复的这段时间,称为睡眠时间。判断标准是动物翻转后 1 min 内不能恢复原状,重复 3 次,阳性为翻正反射消失;反之,动物翻转后 1 min 内立刻恢复原状,重复 3 次,阳性为翻正反射恢复。本实验中,运用翻正反射消失模型验证地西洋和唑吡坦的催眠作用,考察腹腔注射或者灌胃氟马西尼的催醒作用,探讨氟马西尼口服给药的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要药品

氟马西尼(湖南华纳大药厂有限公司,批号:160621);地西洋注射液(上海旭东海普药业有限公司,2 ml:10 mg,批号:AH160401);唑吡坦(鲁南贝

特制药有限公司,批号:108160901);戊巴比妥钠(德国 Merck 公司,批号:160509);所有供试液均为实验前新鲜配置。

### 1.2 仪器、试剂与动物

MS205DU 型十万分之一电子天平(瑞士 Mett-ler Toledo 公司);NANO pure Diamond™ 超纯水机(美国 Barnstead 公司);DMSO(国药集团化学试剂公司,批号:20160706);0.9% 氯化钠溶液(山东华路制药有限公司,批号:161013);去离子水(实验室超纯水机自制)

昆明种小鼠(SPF 级,雄性,体重 22~30 g),由第二军医大学实验动物中心提供。动物可以自由饮水、进食,于(22±2)℃温度下饲养,相对湿度维持在 70% 左右,所有操作均严格按照《第二军医大学实验动物管理指南》执行。动物许可证号:SCXK(沪)2017-0003。

### 1.3 地西洋和唑吡坦对戊巴比妥钠致小鼠翻正反射消失的影响

考察地西洋和唑吡坦是否具有催眠作用。具体方法:动物提前 30 min 腹腔注射地西洋和唑吡坦,然后腹腔注射戊巴比妥钠,以小鼠翻正反射消失时间及恢复时间为指标,记录相应的睡眠潜伏期和睡眠时间<sup>[6]</sup>。在实验之前进行预实验,确定了具有催眠作用的戊巴比妥钠阈剂量为 45 mg/kg,既能保证 100% 实验动物入睡,又能保证睡眠时间不会过长以免影响实验观察。

实验选在恒温、恒湿、安静的房间中进行,时间为下午 13:00—17:00 之间。在上述模型基础上,课题组根据待试药物性质和实验目的,将实验动物分为 3 组,即生理盐水+戊巴比妥钠组(S+W);地西洋+戊巴比妥钠组(D+W);唑吡坦+戊巴比妥钠组(Z+W)。以小鼠翻正反射消失时间及恢复时间为指标,记录相应的睡眠潜伏期和睡眠时间,比较 3 组睡眠潜伏期和睡眠时间的数据,考察地西洋和唑吡坦对戊巴比妥钠致翻正反射消失的影响<sup>[8]</sup>。具体操作见图 1 和表 1。

### 1.4 腹腔注射氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响

在明确地西洋和唑吡坦有催眠作用的基础上,进一步考察腹腔注射氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响。具体方法:动物在 0 min 时腹腔注射氟马西尼,在 20 min 时腹腔注射地西洋和唑吡坦,在 50 min 时腹腔注射戊巴比妥钠,以小鼠翻正反射消失时间及恢复时间为指标,记录相应的睡眠潜伏期和睡眠时间,对比相同条件下“1.3”项下的数

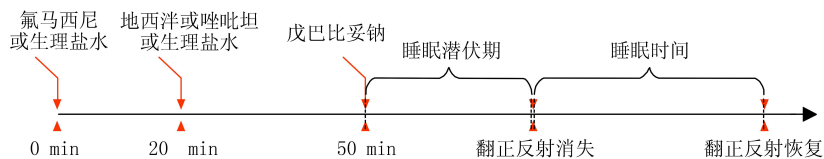


图1 受试药物对戊巴比妥钠致翻正反射消失的影响实验操作图

据,考察腹腔注射氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响。具体操作见表2。

表1 各组实验小鼠腹腔注射给药的时间和剂量(n=6)

组别	给药时间(t/min)		
	0	20	50
对照组(S+W)	生理盐水	生理盐水	戊巴比妥钠(45 mg/kg)
地西洋组(D+W)	生理盐水	地西洋(3 mg/kg)	戊巴比妥钠(45 mg/kg)
唑吡坦组(Z+W)	生理盐水	唑吡坦(6 mg/kg)	戊巴比妥钠(45 mg/kg)

表2 腹腔注射氟马西尼对两组药物催眠作用影响实验的给药时间及剂量(n=6)

组别	给药时间(t/min)		
	0	20	50
地西洋组 F(ip)+D+W	氟马西尼(3 mg/kg)	地西洋(3 mg/kg)	戊巴比妥钠(45 mg/kg)
唑吡坦组 F(ip)+Z+W	氟马西尼(3 mg/kg)	唑吡坦(6 mg/kg)	戊巴比妥钠(45 mg/kg)

### 1.5 灌胃给药氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响

根据“1.3”实验可知,地西洋和唑吡坦有催眠作用,“1.4”实验评价了氟马西尼腹腔注射对催眠作用的影响,“1.5”实验改变氟马西尼的给药途径,考察灌胃给药氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响。具体方法:动物灌胃给药氟马西尼,随后20 min腹腔注射地西洋和唑吡坦,最后在50 min时腹腔注射戊巴比妥钠,以小鼠翻正反射消失时间及恢复时间为指标,记录相应的睡眠潜伏期和睡眠时间,对比相同条件下“1.3”项下的数据,考察灌胃给药氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响。具体操作见表3。

## 2 实验结果及分析

### 2.1 地西洋和唑吡坦对戊巴比妥钠致翻正反射消失的影响

由图2可知,S+W组的睡眠潜伏期为(4.44±0.27) min,而D+W和Z+W组睡眠潜伏期也仅

表3 灌胃给药氟马西尼对两组药物催眠作用影响实验的给药时间及剂量(n=6)

组别	给药时间(t/min)		
	0	20	50
地西洋组 F(ip)+D+W	氟马西尼(30 mg/kg, ig)	地西洋(3 mg/kg, ip)	戊巴比妥钠(45 mg/kg, ip)
唑吡坦组 F(ip)+Z+W	氟马西尼(30 mg/kg, ig)	唑吡坦(6 mg/kg, ip)	戊巴比妥钠(45 mg/kg, ip)

仅是(5.04±0.23) min和(4.61±0.46) min,可见其睡眠潜伏期差别不大。

但在睡眠时间上,S+W组为(45.29±0.97) min,而D+W和Z+W组分别为(123.42±9.13) min和(62.31±4.77) min。与S+W组相比,小鼠睡眠时间显著增加,差异非常显著(P<0.001, P<0.05)。表明在此模型基础上,可以验证地西洋和唑吡坦对戊巴比妥钠处理小鼠有明显的催眠效应。

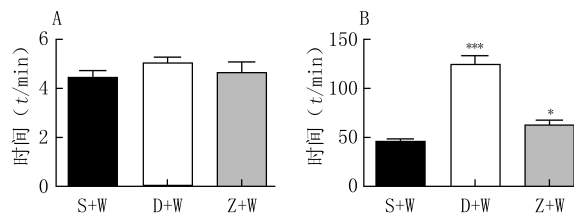


图2 地西洋和唑吡坦对戊巴比妥钠致翻正反射消失小鼠的影响

n=6; \* P<0.05, \*\*\* P<0.001, 与S+W组比较; A.睡眠潜伏期; B.睡眠时间

### 2.2 腹腔注射氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响

由图3可知,提前50 min腹腔注射氟马西尼的F(ip)+D+W和F(ip)+Z+W组小鼠的睡眠时间分别为(78.72±3.31) min和(43.01±1.58) min,与D+W和Z+W组小鼠的睡眠时间(123.42±9.13) min和(62.31±4.77) min相比,显著降低,差异非常显著(P<0.001, P<0.05)。表明腹腔注射氟马西尼能够拮抗地西洋和唑吡坦的催眠作用,减少被两药催眠小鼠的睡眠时间,进而催醒小鼠。

### 2.3 灌胃给药氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作

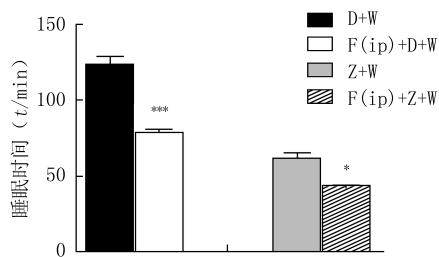


图3 腹腔注射氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响

n=6; \* P<0.05, 与Z+W组比较;  
\*\*\* P<0.001, 与D+W组比较

### 用的影响

由图4可知,提前50 min灌胃给药氟马西尼的F(ig)+D+W和F(ig)+Z+W组小鼠的睡眠时间分别为(65.72±10.00) min和(33.28±4.24) min,与D+W和Z+W组小鼠的睡眠时间(123.42±9.13) min和(62.31±4.77) min相比,显著降低,差异非常显著(P<0.001, P<0.05)。表明灌胃给药氟马西尼同样能够拮抗地西洋和唑吡坦的催眠作用,减少被两药催眠小鼠的睡眠时间。

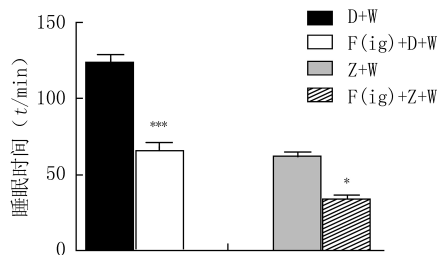


图4 灌胃给药氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响

n=6; \* P<0.05, 与Z+W组比较;  
\*\*\* P<0.001, 与D+W组比较

### 3 讨论

《新药(西药)临床及临床前研究指导原则汇编》指出,在做正式实验之前,应摸准既能使小鼠100%入睡、又不使睡眠时间过长的戊巴比妥钠的剂量(30~60 mg/kg)<sup>[7]</sup>。进行戊巴比妥钠剂量的预实验,给予小鼠低(30 mg/kg)、中(45 mg/kg)、高(60 mg/kg)3种剂量的戊巴比妥钠,观察小鼠的睡眠时间。结果显示,低剂量时小鼠不能100%入睡,高剂量时小鼠睡眠时间过长,长达(85.79±1.67) min,不利于后续验证试验的开展,因此选取中间剂量(45 mg/kg),此时小鼠的睡眠时间为(45.29±0.97) min,能满足《指导原则》的要求,方便后续实验的开展。

进行地西洋和唑吡坦的催眠实验时,本研究初筛了研究剂量,Forouzanfar等<sup>[8]</sup>以3 mg/kg的地西洋剂量能观察到明显的催眠效应,因此预试验以3 mg/kg的地西洋和唑吡坦验证催眠效果,结果表明地西洋以3 mg/kg的剂量能满足本实验需求,但3 mg/kg的唑吡坦剂量过低,没有观察到戊巴比妥钠诱导睡眠小鼠的睡眠时间延长,于是逐步加大唑吡坦预实验剂量,发现以6 mg/kg剂量的唑吡坦给药,小鼠的睡眠时间与对照组(D+W)有统计学差异(P<0.05),因此本实验中唑吡坦剂量选择6 mg/kg。

Koga<sup>[9]</sup>在实验中选用3 mg/kg的氟马西尼腹腔注射催眠小鼠,刘正<sup>[6]</sup>在实验中也选取3 mg/kg的氟马西尼腹腔注射给药拮抗3 mg/kg地西洋的催眠作用,结果显示在此剂量下能显著缩短小鼠的睡眠时间(P<0.001)。实验开始前进行预实验验证,确实能观察到小鼠睡眠时间显著缩短,因此腹腔注射氟马西尼剂量为3 mg/kg。根据文献<sup>[10-12]</sup>报道,氟马西尼的口服生物利用度在10%~20%之间。因此,本研究灌胃剂量为30 mg/kg,在灌胃给药氟马西尼对地西洋和唑吡坦催眠作用的影响中,观察到了预期的实验结果。

综上,以翻正反射消失模型为基础,本研究验证了地西洋和唑吡坦的催眠作用,并在此基础上验证了氟马西尼能拮抗地西洋和唑吡坦镇静催眠的药理作用。同时,在氟马西尼的给药途径上有所创新,对比了腹腔注射与口服给药的效果,结果显示,口服氟马西尼仍然有效,能够发挥其相应的药理作用,表明氟马西尼口服给药在剂型优化上具有可行性。

### 【参考文献】

- [1] 徐利君,徐仙娥,林利芬.镇静催眠药物的研究进展[J].海峡药学,2014,26(11):17-21.
- [2] 李洪涛,吴秀云,赵芹,等.氟马西尼对丙泊酚复合舒芬太尼全麻患者血浆中食欲素A的影响[J].中国临床研究,2017,30(5):592-595.
- [3] Trotti LM, Saini P, Koola C, et al. Flumazenil for the treatment of refractory hypersomnolence: clinical experience with 153 patients[J]. J Clin Sleep Med, 2016, 12(10): 1389-1394.
- [4] 王芝燕.地西洋-布洛芬栓制备及质量标准研究[J].临床合理用药杂志,2016,9(35):89-90.
- [5] 叶晨静,龚艳春.失眠症的临床治疗及效果评定[J].中国实用医药,2017,12(6):124-125.
- [6] 刘正.建立镇静催眠药临床前药效学评价方法和研究西红花有效成分的催眠作用及机制[D].上海:复旦大学,2010.

(下转第54页)

属配合物后,可增强其抗氧化能力,而槲皮素-金属离子配合物的抗肿瘤等其他活性作用及药理作用机制,都是值得进一步探究的有趣课题。

### 【参考文献】

- [1] Miles SL, McFarland M, Niles RM. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease[J]. *Nutr Rev*, 2014, 72(11): 720-734.
- [2] Rani N, Velan LPT, Vijaykumar S, *et al.* An insight into the potentially old-wonder molecule-quercetin: the perspectives in foresee[J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 1:1-16.
- [3] Nabavi SF, Russo GL, Daglia M. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat! [J]. *Food Chem*, 2015, 179:305-310.
- [4] Gormaz JG, Quintremil S, Rodrigo R. Cardiovascular disease: A target for the pharmacological effects of quercetin [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(17): 1735-1742.
- [5] Xiao ZP, Wang XD, Peng ZY, *et al.* Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(42): 10572-10577.
- [6] 夏玉明, 朴惠善, 许妍姬, 等. 槲皮素过渡金属锌配合物的合成[J]. *延边大学学报(自然科学版)*, 1999, 25(1): 37-39.
- [7] de Souza RF, De Giovanni WF. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2005, 61(9): 1985-1990.
- [8] Tan J, Wang B, Zhu L. DNA binding, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, and molecular modeling study of quercetin zinc(II) complex[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(2): 614-620.
- [9] Primikyri A, Mazzone G, Lekka C, *et al.* Understanding zinc(II) chelation with quercetin and luteolin: a combined NMR and theoretical study[J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119(1): 83-95.
- [10] 曾旭, 叶丹荣, 林德昌, 等. 含铋配合物与奈瑟氏菌铁结合蛋白的反应性质研究[J]. *无机化学学报*, 2011, 27(11): 2179-2184.
- [11] 王海燕, 曾秀, 张成平, 等. 槲皮素金属螯合物的研究与应用[J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 361-364.
- [12] de Souza RF, De Giovanni WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions [J]. *Redox Rep*, 2004, 9(2): 97-104.
- [收稿日期] 2016-12-08 [修回日期] 2017-04-25  
[本文编辑] 李睿旻
- 
- (上接第33页)
- [7] 中华人民共和国卫生部. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编[M]. 中华人民共和国卫生部药政局, 1993.
- [8] Forouzanfar F, Hosseini A, Amiri M S, *et al.* Potentiating effects of *Perovskia abrotanoides* Karel. on pentobarbital-induced sleep[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2017, 7(3): 214-222.
- [9] Koga N, Yamaguchi T, Lee KK, *et al.* Kososan, a standardized traditional Japanese herbal medicine, reverses sleep disturbance in socially isolated mice via GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complex activation [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5): 697-703.
- [10] Roncari G, Ziegler WH, Guentert TW. Pharmacokinetics of the new benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 in man following intravenous and oral administration [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1986, 22(4): 421-428.
- [11] Klotz U, Kanto J. Pharmacokinetics and clinical use of flumazenil (Ro 15-1788)[J]. *ClinPharmacokinet*, 1988, 14(1): 1-12.
- [12] Kasteleijn-Nolst Trenite DG, Groenwold RH, Schmidt B, *et al.* Single dose efficacy evaluation of two partial benzodiazepine receptor agonists in photosensitive epilepsy patients: A placebo-controlled pilot study[J]. *Epilepsy Res*, 2016, 122: 30-36.
- [收稿日期] 2017-09-28 [修回日期] 2017-10-23  
[本文编辑] 李睿旻