

• 药理与临床 •

冰片对阿魏酸钠在小鼠血浆和脑区中分布的影响

林竹贞^{1,2}, 姚美村¹, 蓝明雄³, 刘培庆¹, 钟国平¹, 皮荣标^{1*}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510080; 2. 广州医学院护理学院, 广东 广州 510180;

3. 东莞市药品检验所, 广东 东莞 523109)

摘要:目的 探讨剂量因素及冰片对阿魏酸钠在小鼠血浆和脑区中药动学的影响。方法 经 ig 给予小鼠单用高、低剂量阿魏酸钠或复合不同剂量冰片的低剂量阿魏酸钠, 采用 HPLC 法测定高剂量阿魏酸钠在达峰时间及低剂量阿魏酸钠在不同时间点的血浆和脑区中药物浓度, 采用 PCNONLIN 程序计算药动学参数。结果 单给阿魏酸钠低剂量组, 其 t_{max} 为 5.0 min, C_{max} 为 44.1 $\mu\text{g/mL}$, AUC_{0-30} 为 853.9 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$; 脑区中海马 AUC_{0-30} 为 11.8 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, t_{max} 为 5.0 min, C_{max} 为 1.4 $\mu\text{g/g}$; 阿魏酸钠高剂量组与低剂量组比较, 血药浓度仅增加 2.5 倍; 脑区中浓度增加最多的小脑也仅增加 1.9 倍, 其中海马没有增加; 联用冰片后, 冰片能加快阿魏酸钠在海马的分布, 并显著提高其在海马中的量。阿魏酸钠 200 mg/kg 联用冰片 50 mg/kg, 海马 C_{max} 与 AUC_{0-30} 分别增加 1.2 倍和 1.7 倍。结论 单纯加大阿魏酸钠的给药剂量不能相应提高其在脑中的浓度, 联用冰片可提高其脑内(特别是海马)的生物利用度, 阿魏酸钠联用冰片在治疗脑缺血等中枢神经系统疾病中可能有显著的临床意义。

关键词:冰片; 阿魏酸钠; 高效液相色谱; 血药浓度; 脑区

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0551-05

Effects of borneol on distribution of sodium ferulate in plasma and in brain regions of mice

LIN Zhu-zhen^{1,2}, YAO Mei-cun¹, LAN Ming-xiong³, LIU Pei-qing¹, ZHONG Guo-ping¹, PI Rong-biao¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Nurse School of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China; 3. Dongguan Institute for Drug Control, Dongguan 523109, China)

Abstract: **Objective** To explore the pharmacokinetics of dosage factor and borneol on sodium ferulate (SF) in plasma and in brain regions of mice. **Methods** Mice were treated with SF (ig) alone or accompanied by borneol in different doses, the sample from plasma and different brain regions were obtained at different time points (2.5, 5, 7.5, 10, 15, and 30 min), respectively after application of SF. HPLC was employed to determine the concentrations of SF in plasma and in brain regions of mice. Pharmacokinetic parameters were assayed by using PCNONLIN software. **Results** AUC_{0-30} , t_{max} , and C_{max} of single low dose SF (0.2 g/kg) in plasma were 853.9 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$, 5.0 min, and 44.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively and that in hippocampus were 11.8 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 5.0 min, and 1.4 $\mu\text{g/g}$, respectively; Single high dose SF (2 g/kg, ig) could only increase 2.5 times in plasma and 1.9 times in cerebellar region compared to single low dose SF (0.2 g/kg, ig). No changes was found in hippocampus. Borneol (50 mg/kg) not only accelerated the distribution of SF in hippocampus (t_{max} in advance 2.5 min), but also increased the concentration of that in plasma. Compared to single low dose SF (0.2 g/kg) group, the C_{max} and AUC_{0-30} are increased to 1.2 times and 1.7 times, respectively in hippocampus in single low dose SF (0.2 g/kg) plus borneol (50 mg/kg) group. **Conclusion** Increasing the dose of SF alone dose not increase the concentration of SF appropriately in brain. The concentration of SF in plasma and that in brain regions are increased by borneol. Totally, these results suggest that the application of SF combined with borneol for CNS diseases, such as brain ischemia, might be more effective in clinic.

Key words: borneol; sodium ferulate (SF); HPLC; blood concentration; brain region

阿魏酸是当归、川芎等中药中的主要有效成分, 现已发现, 阿魏酸具有明显的保护心肌缺血、抗血小

收稿日期: 2007-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400547); 广东省自然科学基金资助项目 (04300310)

作者简介: 林竹贞 (1980—), 女, 广东博罗人, 在职药理学硕士, 实验师, 药师, 主要从事药剂学与药动学的教学、科研工作。

Tel: (020) 86600073 E-mail: heawilllin@163.com

* 通讯作者 皮荣标 Tel: (020) 87333081 E-mail: pib@mail.sysu.edu.cn

板聚集、抗脂质过氧化等药理活性^[1]。研究表明阿魏酸对缺血性脑损伤有保护作用^[2]。阿魏酸水溶性不大,常制成钠盐应用。但因其脂溶性低,能透过血脑屏障进入脑区的浓度较低^[3]。天然冰片主要成分是龙脑,冰片能促进多种中枢神经系统药物透过血脑屏障^[4]。研究发现冰片具有抗脑缺血损伤作用和加速脑缺血后脑血管内皮的修复^[5,6]。为提高阿魏酸对脑血管疾病的疗效,本研究首次探讨冰片对阿魏酸钠血药浓度和在脑区分布的影响。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,(25±5)g,由中山大学实验动物中心提供(合格证号 SCXK 粤 2004-0011),实验前 12 h 空腹。

1.2 试药:阿魏酸钠(质量分数 98%,曲阜市弘利化工有限公司,批号 0060925),冰片(质量分数 95%,广州市中医院提供),乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。制剂配制:单用阿魏酸钠组分别用蒸馏水配制高、低剂量阿魏酸钠溶液和用 37% 乙醇配制阿魏酸钠乙醇溶液,阿魏酸钠复合冰片组用 37% 乙醇配制混合溶液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:美国 Waters 1525 高效液相色谱仪(Empower 色谱工作站)。色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.085% 磷酸溶液(25:75);体积流量:1.0 mL/min;柱温:室温;进样量:血浆 50 μL,脑匀浆 100 μL。

2.2 对照品溶液的配制:准确称取阿魏酸钠 120.9 mg 于 50 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容,用流动相稀释成质量浓度依次为 0.483 6、48.36 μg/mL 的工作溶液。

2.3 血浆样品的制备:小鼠摘除眼球取静脉血 0.5 mL,用肝素抗凝,-4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液获得血浆。取 0.1 mL 血浆置具塞离心管中,加 1 mol/L 盐酸溶液 50 μL,乙醚 2 mL,2 600 r/min 混旋 5 min,再 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液置 40℃ 水浴挥干,用流动相 0.2 mL 复溶,2 600 r/min 混旋 5 min,置微量进样管中,备用。

2.4 脑匀浆的制备:小鼠取完血后立即取出脑组织,按皮层、海马、纹状体、小脑分置 4 个已称质量的试管中,精密称质量,加入 0.5 mL 生理盐水,用电动混匀器充分搅匀,加入 3 mL 乙醚,其余与血浆样品的制备加乙醚后步骤相同。

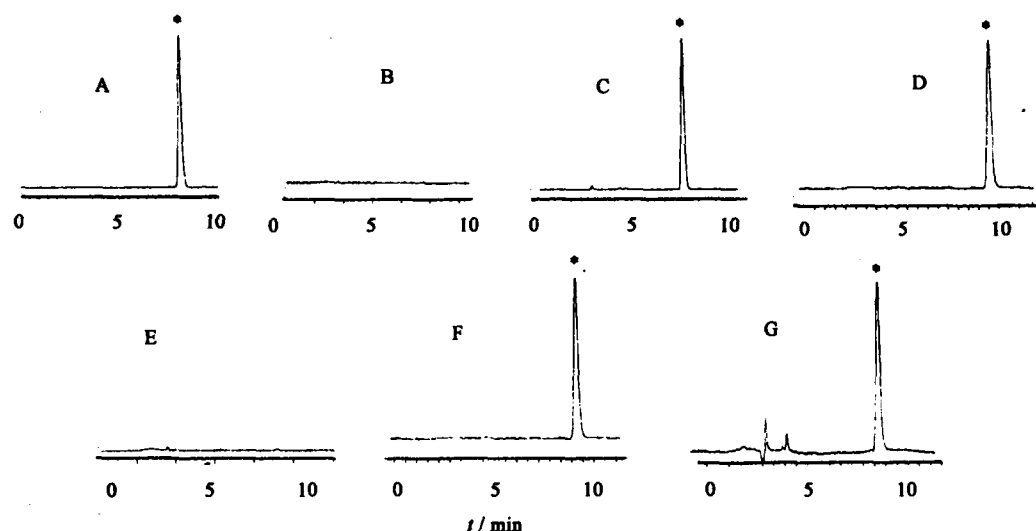
2.5 阿魏酸钠的测定

2.5.1 方法专属性考察:取小鼠空白血浆、空白皮

层、空白海马、空白纹状体、空白小脑、阿魏酸钠对照品、空白血浆加阿魏酸钠对照品、空白皮层加阿魏酸钠对照品、空白海马加阿魏酸钠对照品、空白纹状体加阿魏酸钠对照品、空白小脑加阿魏酸钠对照品,按血浆、脑匀浆处理方法,分别进样、测定。在上述色谱条件下,阿魏酸钠的出峰时间为 8.3 min,与血浆和脑匀浆中的蛋白质及内源性物质均能很好地分离,无干扰。阿魏酸钠给药后,在血浆和脑区中阿魏酸钠与药后代谢物也能很好地分离,药后代谢物对阿魏酸钠的出峰无干扰。其中摘选了血浆与脑区中海马的色谱图,脑区中的皮层、纹状体、小脑的色谱图与海马相同。见图 1。

2.5.2 标准曲线的绘制:小鼠 ig 生理盐水,分取血浆、皮层、海马、纹状体和小脑。精密吸取 0.1 mL 血浆,精密加入不同质量浓度不同体积的阿魏酸钠工作溶液,配成质量浓度相当于 0.120 9、0.362 7、1.209、3.627、10.881、24.180、60.450、86.720 μg/mL 的血浆对照品溶液。精密吸取 0.5 mL 空白海马,精密加入不同质量浓度不同体积的阿魏酸钠工作溶液,配成质量浓度相当于 19.344、48.360、96.72、241.8、483.6、1 450.8、4 352.4 ng/mL 的海马对照品溶液。皮层、小脑、纹状体与海马同法操作。按血浆样品、脑匀浆的制备方法处理、进样测定。以阿魏酸钠的峰面积(A)为纵坐标,阿魏酸钠质量浓度(C,血浆 μg/mL,脑匀浆 ng/mL)为横坐标,按最小二乘法进行回归,得血浆样品回归方程为 $A = 305\,545\,C + 127\,344$, $r = 0.999\,7$;皮层回归方程为 $A = 743\,C + 43\,586$, $r = 0.989\,3$;海马回归方程为 $A = 1\,236\,C + 36\,733$, $r = 0.999\,9$;纹状体回归方程为 $A = 1\,424\,C + 2\,746$, $r = 0.999\,9$;小脑回归方程为 $A = 1\,256\,C - 135\,763$, $r = 0.993\,7$ 。结果表明阿魏酸钠在血浆中 0.120 9~86.72 μg/mL 线性关系良好;在各脑区中 19.344~4 352.4 ng/mL 线性关系良好。

2.5.3 萃取回收率:取阿魏酸钠的工作溶液,配制低、中、高 3 个质量浓度(0.362 7、3.627、86.720 μg/mL)的含药血浆各 5 份,按血浆样品处理方法处理并进样,同时,配制对应的阿魏酸钠低、中、高 3 个质量浓度(0.181 35、1.813 5、43.360 μg/mL)的流动相溶液,比较相应质量浓度下的阿魏酸钠峰面积,结果低、中、高质量浓度的萃取回收率分别为 84.4%、86.2%、87.6%;配制阿魏酸钠低、中、高 3 个质量浓度(48.360、483.6、4 352.4 ng/mL)的含药海马各 5 份,按海马样品处理方法处理并进样,同



A-阿魏酸钠对照品 B-空白血浆 C-空白血浆+阿魏酸钠对照品 D-阿魏酸钠给药后血浆样品 E-空白海马
F-空白海马+阿魏酸钠对照品 G-阿魏酸钠给药后海马 * -阿魏酸钠
A-SF reference substance B-blank plasma C-blank plasma+SF reference substance D-plasma sample after ig SF
E-blank hippocampus F-blank hippocampus+SF reference substance G-hippocampus after ig SF * -SF

图1 小鼠血浆和脑区样品的HPLC图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of sample in plasma and in brain regions of mice

时,配制对应的阿魏酸钠低、中、高3个质量浓度(120.9、1 209、10 881 ng/mL)的流动相溶液,比较相应质量浓度下的阿魏酸钠峰面积,结果低、中、高质量浓度的萃取回收率分别为86.1%、86.8%、88.5%;小脑、皮层、纹状体与海马同法处理,结果小脑中低、中、高质量浓度的萃取回收率分别为87.4%、88.9%、90.4%;皮层中低、中、高质量浓度的萃取回收率分别为80.1%、79.9%、81.4%;纹状体中低、中、高质量浓度的萃取回收率分别为84.3%、88.2%、89.5%。

2.5.4 精密度与稳定性试验:取阿魏酸钠的工作溶液,配制低、中、高3个质量浓度(0.362 7、3.627、86.720 $\mu\text{g/mL}$)的含药血浆1 mL,按血浆样品处理方法处理并进样;同时,配制阿魏酸钠低、中、高3个质量浓度(48.360、483.6、4 352.4 ng/mL)的含药海马5 mL,按海马样品处理方法处理并进样,小脑、皮层、纹状体与海马同法处理。避光4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,分别以0、1、2、4、8、12 h进样,计算日内RSD和12 h内稳定性,并分别在3 d测定计算日间RSD。血浆样品低、中、高质量浓度的日内RSD($n=6$)依次为2.31%、2.87%、3.08%;海马日内RSD依次为3.05%、3.52%、3.31%;小脑日内RSD依次为4.21%、3.96%、4.33%;皮层日内RSD依次为4.52%、3.52%、4.32%;纹状体日内RSD依次为4.32%、3.45%、2.55%。结果表明,样品在12 h内

可保持稳定。但在血浆和脑各区中,低、中、高质量浓度的阿魏酸钠日间RSD($n=3$)均大于10%,峰面积呈下降趋势。

2.5.5 重现性试验:取阿魏酸钠的工作溶液,配制低、中、高3个质量浓度(0.362 7、3.627、86.720 $\mu\text{g/mL}$)的含药血浆各5份,按血浆样品处理方法处理并进样;同时,配制阿魏酸钠低、中、高3个质量浓度(48.360、483.6、4 352.4 ng/mL)的含药海马各5份,按海马样品处理方法处理并进样,小脑、皮层、纹状体与海马同法处理。结果以峰面积计算RSD,血浆样品低、中、高质量浓度的RSD依次为2.21%、1.47%、3.25%;海马中RSD依次为5.04%、3.92%、3.31%;小脑中RSD依次为5.44%、5.83%、4.85%;皮层中RSD依次为6.24%、7.94%、6.33%;纹状体中RSD依次为4.04%、3.82%、3.35%。

2.5.6 方法回收率试验:取含阿魏酸钠的工作溶液,配制低、中、高3个质量浓度(12.141、26.980、67.450 $\mu\text{g/mL}$)的含药血浆各3份;配制阿魏酸钠低、中、高3个质量浓度(241.8、725.4、4 352.4 ng/mL)的含药皮层、小脑各3份;配制阿魏酸钠低、中、高3个质量浓度(241.8、1 450.8、4 352.4 ng/mL)的含药海马、纹状体各3份;代入回归方程计算,以测得值与加入值的比值计算回收率。血浆阿魏酸钠回收率分别为(102.4 $\pm$ 3.0)%、(102.2 $\pm$

2.7)%、(113.1±4.1)%；皮层阿魏酸钠回收率分别为 (96.8±4.6)%、(95.9±8.1)%、(95.3±4.2)%；海马阿魏酸钠回收率分别为 (98.6±3.3)%、(92.4±4.2)%、(109.3±4.5)%；纹状体阿魏酸钠回收率分别为 (109.3±1.3)%、(92.3±12.5)%、(111.7±2.0)%；小脑阿魏酸钠回收率分别为 (111.5±2.6)%、(103.2±1.0)%、(87.7±1.7)%。

2.6 动物试验

2.6.1 阿魏酸钠在血浆和脑区中质量浓度的测定：将小鼠随机分为 8 组，每组 5 只，以阿魏酸钠 200 mg/kg 剂量 ig 阿魏酸钠溶液，分别于给药后 1、2.5、5、10、15、30、60、240 min 分别取血浆与脑区中的海马、皮层、小脑、纹状体，并按上法处理。用 HPLC 法测定其中阿魏酸钠质量浓度。结果显示，阿魏酸钠在血浆中 5 min 就达到最大质量浓度为 67.38 $\mu\text{g/mL}$ ，到 4 h 基本消除完全；而其在脑区的吸收比血浆稍慢，皮层与小脑的达峰时间为 10 min，海马与纹状体要在 15 min 才达到最大吸收。阿魏酸钠血药浓度比脑区中的浓度要大。给药后 10 min 时，血浆的质量浓度是皮层的 22 倍、海马的 10 倍、纹状体的 12 倍、小脑的 21 倍（以 1 mL 血浆相当于 1 g 脑组织计算）。结果见图 2 与图 3。

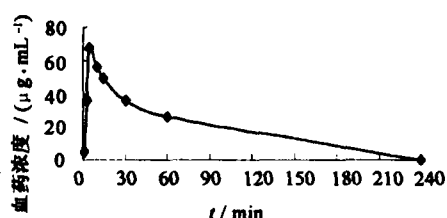


图 2 阿魏酸钠在血浆中的药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 2 Concentration-time curve of SF in plasma

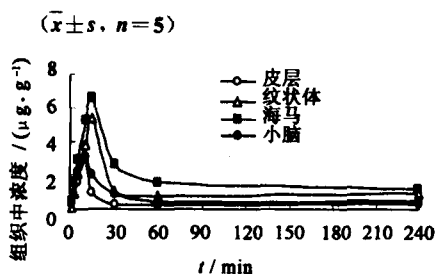


图 3 阿魏酸钠在脑区中的药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Concentration-time curve of SF in brain regions ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.6.2 高剂量阿魏酸钠在血浆和脑中的分布：将小鼠随机取 5 只，以 2 g/kg 高剂量 ig 阿魏酸钠水溶液，分别于给药后 10 min 分别取血浆与脑区中海

马、皮层、小脑、纹状体，并按上法处理。用 HPLC 法测定其中阿魏酸钠质量浓度。结果显示，阿魏酸钠给药剂量增加了 10 倍，但在血浆中的阿魏酸钠与低剂量组比较，只增加 2.5 倍；脑区中的阿魏酸钠分别在皮层、小脑中增加 1.5 倍、1.9 倍，而在海马与纹状体无增加，结果见表 1。

表 1 高低剂量阿魏酸钠给药后 10 min 血浆和脑区中质量浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Determination of high and low dose SF in plasma and in brain regions in 10 min ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

样品	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血浆/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	皮层/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	海马/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	纹状体/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	小脑/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
阿魏酸钠	200	56.10±2.60	2.96±0.78	5.29±1.21	3.80±1.88	3.10±0.87
	2 000	138.57±8.26	4.56±0.45	4.40±0.33	3.19±0.18	5.76±0.83

2.6.3 复合冰片后阿魏酸钠在血浆和海马中质量浓度测定：将小鼠随机分为 4 组，每组 35 只，A 组为阿魏酸钠 200 mg/kg 的乙醇溶液；B、C、D 组分别为阿魏酸钠 200 mg/kg 复合 2、10、50 mg/kg 冰片的乙醇溶液。ig 后于 1、2.5、5、7.5、10、15、30 min 分别取样，并按上法处理血浆与海马。用 HPLC 法测定其中阿魏酸钠浓度，采用非房室模型计算药动学参数。复合冰片组的阿魏酸钠在海马中的达峰时间 (t_{max}) 比单用组提前了 2.5 min；复合 2、10、50 mg/kg 冰片组阿魏酸钠在血浆和海马中的浓度比单用组有不同程度的提高，峰浓度 (C_{max}) 在血浆中分别增加了 45.8%、31.0%、31.8%；海马分别增加了 47.2%、24.5%、25.9%。AUC₀₋₃₀ 在血浆中分别增加了 3.1%、14.9%、3.0%；海马分别增加了 44.1%、19.5%、66.1%。采用 t 检验作统计分析，单用组与复合组之间差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 4、图 5，药动学参数见表 2。

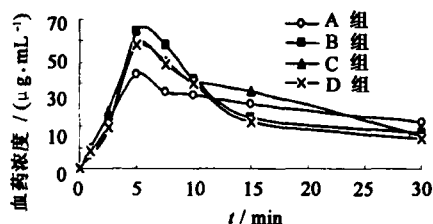


图 4 阿魏酸钠复合不同剂量冰片在血浆中的药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Concentration-time curve of SF with borneol in different doses in plasma ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3 讨论

本实验建立的 HPLC 法测定小鼠 ig 给药后阿魏酸钠在血浆和脑区中的量，是参阅文献方法^[7,8]并经反复摸索确定下来的。采用外标法测定，操作相对

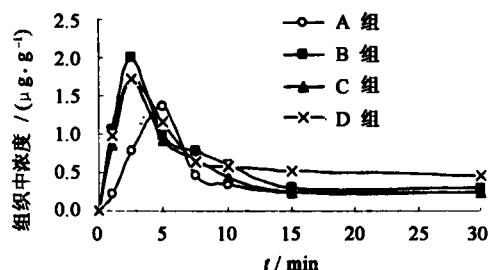


图 5 阿魏酸钠复合不同剂量冰片在海马中的药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 5 Concentration-time curve of SF with borneol in different doses in hippocampus ($n=5$)

表 2 阿魏酸钠复合冰片后阿魏酸钠的药动学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of SF after ig SF with borneol ($n=5$)

组别	t_{max}/min		$C_{max}/(\mu g \cdot mL^{-1})$		$AUC_{0-30}/(\mu g \cdot mL^{-1} \cdot min)$	
	血浆	海马	血浆	海马	血浆	海马
A	5.0±0	5.0±0	44.14±3.90	1.36±0.09	853.9	11.8
B	5.0±0	2.5±0	64.34±5.13	2.00±0.26	880.4	17.0
C	5.0±0	2.5±0	57.82±4.30	1.69±0.15	981.0	14.1
D	5.0±0	2.5±0	58.16±5.11	1.71±0.13	879.7	19.6

简便,节省了时间和溶剂,平均回收率为 102.52%,符合体内药物浓度测定的要求。因小鼠有个体差异,且血浆与脑匀浆成分复杂,需要萃取、纯化、浓集等复杂处理,各份样品的操作很难做到完全平行一致,所以在实验中要尽量减少操作对药物检测的影响,如注意人员的配合与平行操作,并在避光条件下操作避免药物见光分解等。

本实验在处理样品时曾对是否需要加入盐酸进行了比较,发现血样中加入了盐酸可沉淀蛋白,提取率大大提高,重复性好;而对脑各区匀浆的提取率影响不大。阿魏酸的血浆蛋白结合率只有 20.6%^[3],故推测阿魏酸钠在血中主要以离子型酸根为主要存在方式,当加入盐酸后分子型增多,提取率提高。

冰片可迅速透过血脑屏障,具有“独行则势弱,佐使则有功”、“芳香走窜,引药上行”的特点,适宜与他药配伍。许多中成药,如安宫牛黄丸、麝香保心丸和冰硼散等都有冰片的配伍应用。但冰片有一定的毒性,ig 小鼠的 LD_{50} 为 1 059~4 960 mg/kg^[9]。查阅多种中药制剂人用冰片剂量后,本实验确定了小鼠用冰片的剂量为 10 mg/kg,被认为长期服用是安全的。

本研究首次观察了阿魏酸钠在血浆和脑区中海马、皮层、小脑、纹状体的药时曲线,发现阿魏酸钠在血浆的质量浓度远远大于在脑区的质量浓度,验证了阿魏酸能进入血脑屏障,但进入量较低^[3]。在分别

测定低剂量阿魏酸钠给药后脑区中大脑皮层、海马、纹状体、小脑的药物浓度时,本组发现海马的量是最高的,纹状体、小脑次之,皮层最小。海马是认知、学习功能的重要脑区,本实验验证了阿魏酸发挥脑保护作用主要是进入海马的药物浓度较高。如能再增加其在海马中的量对发挥中枢神经保护作用有重要的临床意义。所以,本研究重点考察阿魏酸钠复合冰片后其在血浆和海马的量。复合不同剂量冰片后,阿魏酸钠在血浆和海马中的 C_{max} 与 AUC_{0-30} 均有不同程度的提高(血浆 C_{max} 增加了 31.0%~45.8%, AUC_{0-30} 增加了 3.0%~14.9%;海马 C_{max} 增加了 24.5%~47.2%, AUC_{0-30} 增加了 19.5%~66.1%)。其中在海马的 t_{max} 比单用组提前了 2.5 min,显效更快。结果提示,阿魏酸钠与冰片合用时,临床显效更快,对于促智醒脑、保护脑缺血具有积极意义。因此,建议临床使用阿魏酸治疗脑血管疾病时,可酌情考虑与冰片合用。但本研究采用了冰片高中低 3 种剂量,发现其与阿魏酸钠在血浆和海马的浓度不完全呈正相关,但也有一定的剂量依赖性,这是否与药物的浓度有饱和现象有关,或溶剂对药物有影响,尚待进一步探讨。

本研究还尝试给予小鼠高低不同剂量的阿魏酸钠,发现即使给药剂量增加了 10 倍,但血浆和脑区中阿魏酸质量浓度增加不多。这提示了要增加阿魏酸在脑中的量是不能单靠通过加大阿魏酸的给药剂量来实现,只能通过结构改造或与他药配伍的方法。

因冰片不溶于水,所以阿魏酸钠复合冰片给药时,需要更换溶剂为 37% 乙醇才能溶解高剂量的冰片。本研究发现单阿魏酸钠组的溶剂不同,其在血浆与海马中的药物浓度也不相同。37% 乙醇与蒸馏水比较,血浆与海马中的药物浓度均降低,这是否与乙醇的体积分数过高,诱导肝药酶加速了药物的代谢有关,尚待进一步探讨,但提示要充分考虑溶剂对药物的影响。本研究还曾用 1% 的羧甲基纤维素钠用于复合组的溶剂,结果与用 37% 乙醇为溶剂一致。

参考文献:

- [1] 胡益勇,徐晓玉.阿魏酸的化学和药理研究进展[J].中成药,2006,28(2):253-256.
- [2] 廖松岩,吴华璞,祝晓光.阿魏酸钠对缺血性脑损伤保护作用的研究进展[J].蚌埠医学院学报,2005,30(4):375-377.
- [3] 常向明,徐莲英,陶建生,等.大鼠体内阿魏酸的代谢及药代动力学研究[J].中国中药杂志,1993,18(5):300-302.
- [4] 唐海涛,李力仙,张健,等.冰片开放血脑屏障的研究进展[J].中国神经肿瘤杂志,2005,3(2):124-127.
- [5] 何晓静,肇丽梅,刘玉兰.冰片注射液对实验性脑缺血的保护作用[J].广东药学院学报,2006,22(2):171-173.
- [6] 赵保胜,宓穗卿,张银卿.冰片对大鼠脑微血管内皮细胞

- ICAM-1 表达量的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12 (2): 88-90.
- [7] 徐 术, 胡晋红, 李凤前. HPLC 测定 Beagle 犬血浆中阿魏酸钠的浓度及其药代动力学研究 [J]. 中成药, 2005, 27 (9): 1062-1065.
- [8] 裴 瑾, 杨祖貽, 刘荣敏, 等. HPLC 测定灌胃当归胡椒复方小鼠血浆中阿魏酸的含量 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 523-525.
- [9] 万晓霞. 冰片药理学研究进展 [J]. 广东药学院学报, 1997, 13(2): 115-117.

白桦脂酸对人 Raji 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响

陈 子, 吴秋玲, 陈 燕*, 何 静

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

摘 要:目的 研究 D 类细胞周期蛋白 (cyclin D3) 在 Burkitt 淋巴瘤细胞 Raji 中的表达及白桦脂酸对其的影响。方法 MTT 法检测细胞增殖活性, Annexin-V/PI 双标法检测细胞凋亡, 流式细胞仪检测细胞周期分布, RT-PCR 法分析白桦脂酸作用于 Raji 细胞后 cyclin D3 mRNA 表达的变化, Western blotting 法检测细胞内 cyclin D3 的蛋白表达。结果 白桦脂酸对 Raji 细胞有明显的增殖抑制作用, Annexin-V/PI 双标法显示, 白桦脂酸诱导细胞凋亡呈剂量依赖性。随着白桦脂酸剂量的加大, 凋亡率增高。白桦脂酸作用 Raji 细胞后主要使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, G₀/G₁ 期细胞比例随白桦脂酸剂量增大而逐渐增高, 而 S 期细胞比例随白桦脂酸剂量增大而逐渐降低, 对 G₂/M 期细胞作用不明显。RT-PCR 结果显示白桦脂酸作用于 Raji 细胞使 cyclin D3 mRNA 表达减少, 并与其剂量呈正相关。Western blotting 结果显示白桦脂酸使 cyclin D3 蛋白表达降低, 呈剂量依赖性。结论 白桦脂酸抑制 Raji 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 可使细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 其可通过下调 cyclin D3 表达而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 白桦脂酸; Raji 细胞; 细胞凋亡; cyclin D3

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0556-04

Effect of betulinic acid on proliferation, apoptosis, and cell cycle of human lymphoma cell line Raji

CHEN Zi, WU Qiu-ling, CHEN Yan, HE Jing

(Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anticancer effects and molecular mechanism of betulinic acid (BA) on Raji cells *in vitro*. **Methods** The effects of BA on the growth of Raji cells were studied by MTT assay. Apoptosis was assessed by Annexin-V/PI double-labeled cytometry. The influence on cell cycle was studied by flow cytometer. The cyclin D3 mRNA expression was checked by Western blotting and RT-PCR techniques. **Results** BA showed obvious inhibition on proliferation, as well as induction potency of apoptosis on Raji cells *in vitro* in a time- and dose-dependent manner by Annexin-V/PI double-labeled method. With the IC₅₀ value for 24 h being (39.44 ± 0.65) μg/mL, Raji cells treated with BA showed accumulation in G₀/G₁ phase and reduction in the percentage of cells in S phase. The cyclin D3 mRNA expression and protein were sharply decreased in Raji cells treated with BA. **Conclusion** BA could inhibit the proliferation of Raji cells by regulating the cell cycle that arrests cells at G₀/G₁ phase and induces apoptosis of Raji cells. The antitumor effects of BA may be related to down-regulation of the expression of cyclin D3.

Key words: betulinic acid (BA); Raji cells; cell apoptosis; cyclin D3

白桦脂酸是一种从白桦树皮中提取的五环三萜类化合物。已有多项研究表明其对多种恶性疾病

有治疗作用, 以及抗炎、免疫调节和抗 HIV 病毒活性^[1~3]。Raji 细胞是人 Burkitt 淋巴瘤细胞株。已有

收稿日期: 2007-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500686)

作者简介: 陈 子 (1980—), 女, 湖北人, 硕士研究生, 主要从事恶性血液病研究。E-mail: shirley0188@sina.com

* 通讯作者 陈 燕