

在心肌缺血再灌注损伤中活化的内皮细胞释放 ICAM-1、P 选择素、E 选择素,三者介导白细胞与内皮细胞的黏附。缺血再灌注后白细胞黏附和聚集于缺血组织的血管中,大量白细胞机械性阻塞微血管限制再灌注,活化的中性粒细胞(PMN)释放大量的毒性物质如超氧阴离子、 H_2O_2 及酶类物质,还释放大量炎性介质和细胞因子,吸引更多的白细胞进入组织,形成恶性循环,从而加剧缺血再灌注损伤。因此有效地控制白细胞内皮细胞的黏附,可能成为预防及治疗缺血再灌注损伤的有效方法。

本研究结果表明,心肌缺血再灌注后可引起血清中 CK、LDH 显著升高($P<0.05$)。各用药组中盐酸川芎嗪低剂量组,阿魏酸高低剂量组及盐酸川芎嗪配伍阿魏酸组均可降低血清 CK 水平,其中盐酸川芎嗪配伍阿魏酸作用最好。阿魏酸高、低剂量组及盐酸川芎嗪配伍阿魏酸组均可降低血清 LDH 水平,其中,盐酸川芎嗪配伍阿魏酸及阿魏酸低剂量作用显著。以上结果表明在所选单体中除川芎嗪高剂量组外各用药组均可减轻心肌缺血再灌注损伤。

进一步通过 RT-PCR 法检测缺血半暗带 ICAM-1、P 选择素、E 选择素 mRNA 的表达,来探讨各用药组减轻心肌缺血再灌注损伤的机制。与假手术组比较,模型组 E 选择素、P 选择素、ICAM-1

mRNA 表达均升高。各用药组与模型组比较,盐酸川芎嗪配伍阿魏酸组可以显著降低 E 选择素、P 选择素、ICAM-1 mRNA 表达。

通过本实验,优选出川芎嗪和阿魏酸的配伍,可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤,其作用机制之一可能为抑制内皮细胞黏附分子 ICAM-1、E 选择素、P 选择素 mRNA 表达。

参考文献:

- [1] 王 静, 张密霞, 庄朋伟, 等. 川芎嗪、阿魏酸对心脏微血管内皮细胞白细胞黏附的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26(3): 146-149.
- [2] 徐江平, 孙莉莎, 吴航宇, 等. 丹酚酸 B 对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(8): 595-597.
- [3] Zacharowski K, Olbrich A, Otto M, et al. Effects of the prostanoid EP3-receptor agonists M8B28767 and GR63799X on infarct size caused by regional myocardial ischaemia in the anaesthetized rat[J]. Br J Pharmacol, 1999, 126(4): 849.
- [4] Invernica G, Pontib D, Corsinia E, et al. Human microvascular endothelial cells from different fetal organs demonstrate organ-specific CAM expression[J]. Exp Cell Res, 2005, 308: 273-282.
- [5] Callera G E, Montezano A C, Touyz R M, et al. ETA receptor mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-Salt rats[J]. Hypertension, 2004, 43: 872-879.
- [6] Zeiffer U, Schober A, Lietz M, et al. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines[J]. Circ Res, 2004, 94: 776-784.

积雪草苷大鼠在体肠吸收动力学研究

黄怀鹏, 刘彩霞

(河北平安健康集团, 河北 石家庄 050021)

摘要:目的 研究积雪草苷的在体肠吸收机制。方法 采用大鼠在体肠灌流试验,利用 HPLC 法测定积雪草苷的量,分别研究药物浓度和吸收部位对积雪草苷吸收的影响。结果 在 25~100 $\mu\text{g/mL}$, 小肠吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})无显著性差异。各肠段的 K_a 和 P_{app} 有显著性差异,十二指肠、空肠、回肠、结肠的 K_a 分别为(0.0298 ± 0.0043)、(0.0365 ± 0.0076)、(0.0335 ± 0.0081)、(0.0070 ± 0.0015) min^{-1} , P_{app} 分别为(3.42 ± 0.63) $\times 10^{-3}$ 、(4.02 ± 1.07) $\times 10^{-3}$ 、(3.79 ± 0.77) $\times 10^{-3}$ 、(1.72 ± 0.43) $\times 10^{-3}$ $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论 一定范围的药物浓度对积雪草苷的 K_a 和 P_{app} 无影响,其吸收机制为被动扩散。

关键词:积雪草苷; 液相色谱法; 肠吸收动力学

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)07-1056-03

积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 的干燥全草,积雪草始载于《神农本草经》,具有清热利湿、解毒消肿之功效。积雪草含有积

雪草苷、羟基积雪草苷、积雪草酸、羟基积雪草酸等多种三萜类化合物,积雪草苷为积雪草中的主要活性成分^[1]。本研究采用大鼠在体肠灌流的方法建立

收稿日期:2008-01-15

基金项目:河北省中小企业创新基金(C7C1303192001)

作者简介:黄怀鹏(1971—),男,河北省石家庄市人,博士,副研究员,硕士生导师,主要研究方向为中药新药研究与开发,发表论文40余篇,参编专著3部,获省部级奖励3项,申请专利10项。Tel: (0311) 86109893 E-mail: huang71526@163.com

了积雪草苷大鼠肠吸收模型,采用 HPLC 法测定积雪草苷的量,并对其吸收特性进行研究,以期为积雪草苷制剂的研究提供生物药剂学依据。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂:积雪草苷对照品(质量分数 $\geq 98\%$,购自中新药业公司);积雪草苷样品(实验室自制,含积雪草苷质量分数为 90.3%);乌拉坦(进口分装);Kreb-ringer's 营养液(简称 K-R 液,自配,每 1 000 mL 内含 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaHCO_3 1.37 g, NaH_2PO_4 0.32 g, MgCl_2 0.02 g, 葡萄糖 1.40 g);乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器:高效液相色谱系仪(大连依利特 EC2000 液相色谱系统及其工作站);蠕动泵(天津协达电子有限公司);2—16A 高速台式离心机(上海第六医疗器械厂);AX205 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

1.3 实验动物:Wistar 大鼠,雄性,体质量(250 ± 20) g,购自河北医科大学实验动物中心。

2 方法

2.1 色谱条件:色谱柱为 SinoChrom ODS-BP 柱($200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相:乙腈-水(29:71);体积流量:1.0 mL/min;柱温: 25°C ;检测波长:203 nm。分别取空白肠灌流液(K-R 液)、积雪草苷对照品溶液,以及含有药物的供试液灌流后的收集液, $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过,HPLC 测定,色谱图见图 1。结果表明,积雪草苷的保护时间为 9.6 min,供试液的主峰位置与对照品保留时间一致,空白肠灌流液中内源性物质对积雪草苷无干扰。

2.2 标准曲线的制备:精密称取积雪草苷对照品 10 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加 K-R 液溶解并定容至刻度,摇匀,制成 $400 \mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。分别精密吸取一定量的对照品储备液置 10 mL 棕色量瓶中,用 K-R 液定容至刻度,摇匀,制成质量浓度为 10、25、50、100、200、 $400 \mu\text{g/mL}$ 积雪草苷对照品溶液。在上述色谱条件下,分别进样 $20 \mu\text{L}$,进行 HPLC 测定,记录色谱图,以质量浓度(C)为横坐标,积雪草苷的峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线,得积雪草苷标准曲线: $Y = 6.5277X - 1.67$ ($r = 0.9995$)。结果表明,在 10~ $400 \mu\text{g/mL}$ 积雪草苷的峰面积与质量浓度具有良好线性关系。

2.3 精密度试验:按照 2.2 项下方法,配制 25、50、 $100 \mu\text{g/mL}$ 的积雪草苷对照品溶液,进行日内、日间精密度测定。以 1 d 内不同时间测定同一样品 5

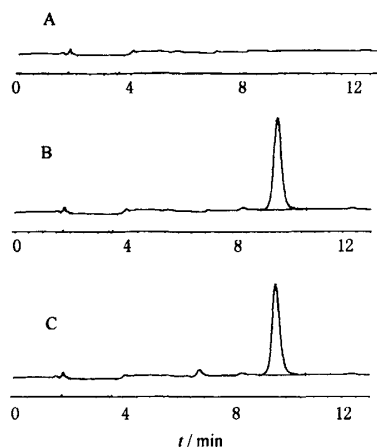


图 1 空白肠液(A)、积雪草苷对照液(B)和灌流后供试液(C)的色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank intestinal juice (A), asiaticoside reference solution (B), and sample solution (C)

次计算日内精密度;以连续测定 5 d 进行分析计算日间精密度。根据标准曲线分别计算出积雪草苷的质量浓度,结果日内精密度 RSD 为 1.79%、1.21%、0.63%,日间精密度 RSD 分别为 1.82%、0.64%、1.65%。

2.4 回收率试验:精密称取积雪草苷对照品溶液,用 K-R 液溶解并稀释成含积雪草苷 25、50、 $100 \mu\text{g/mL}$ 的溶液,于上述色谱条件下测定。以标准曲线计算质量浓度,结果 3 个质量浓度的方法回收率分别为 98.75%、99.26%、99.37% ($n = 5$)。

2.5 积雪草苷在空白肠灌流液中的稳定性考察:分别截取一段长约 10~15 cm 的十二指肠、空肠、回肠、结肠肠段,各肠段两端分别插入塑料管并结扎,先用 37°C 生理盐水将各肠段内容物冲洗干净,后用不含药物的 K-R 液快速充满肠段,再以 0.2 mL/min 的速度持续泵入各肠段,在出口处收集流出液,作为空白肠循环液。用此灌流液配制 25、50、 $100 \mu\text{g/mL}$ 的积雪草苷供试液,置于 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温水浴中保温,分别于 0、4 h 取样,测定此时供试液中剩余的积雪草苷的浓度,根据药物减少的量来考察其稳定性。结果表明,4 h 内积雪草苷的量未发生明显变化,剩余量均大于 99%。说明在实验过程中,积雪草苷在空白肠循环液中保持足够稳定。

2.6 大鼠在体肠吸收实验

2.6.1 在体肠吸收试验^[2,3]:试验前用供试液将管道冲洗至出液口药物浓度与供试液浓度相同,以消除试验过程中管路对药物吸附的影响。取禁食 12 h

(可自由饮水)的大鼠,ip 20% 乌拉坦溶液麻醉(1.3 g/mg)。将大鼠固定于恒温手术台上以保持体温,沿腹中线打开腹腔,分离待考察肠段,长度10~15 cm,于两端切口,用预热至37℃的生理盐水将各肠段内容物冲洗干净,插入塑料管,并结扎固定,将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿。再取用K-R液配制成的供试药液,先将药液快速泵入肠段,使肠段内充满药液,后将流速降至0.2 mL/min,同时开始计时,约0.5 h后,吸收达到稳定状态。进口处用已知质量的装有供试液的小瓶进行灌流,开始每隔15 min在出口处用另一已知质量的小瓶收集一次(同时迅速更换下一个供试液小瓶和收集液小瓶),称质量,计算灌入和收集的供试液的质量。于出口处收集流出的灌流液直到105 min,即分别于计时后的45、60、75、90、105 min取样。实验结束时,将所灌流的肠段剪下,测量其长度和内径。所取样品经0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液20 μL进行HPLC分析,测定积雪草苷的质量浓度。采用质量法按下式计算药物吸收速率常数(K_a)和药物表观吸收系数(P_{app})。

$$K_a = (1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} - \frac{Q_{out}}{C_{in}}) \frac{Q}{V} - Q \cdot \ln \left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) / \frac{2\pi r l}{P_{app}}$$

式中 Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积(mL); C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进出口灌流液的质量浓度(μg/mL); l 和 r 分别为被灌流肠段的长度(cm)和横截面半径(cm); Q 为灌流速度(0.2 mL/min); V 为灌流肠段的体积; K_a 和 P_{app} 为最后5个时间段(45~105 min)样品的平均值

2.6.2 大鼠肠道各区段吸收情况考察:用K-R液配制积雪草苷浓度为50 μg/mL供试品溶液。取大鼠20只,随机分为4组,即十二指肠、空肠、回肠、结肠组,依照2.6.1项下操作,考察大鼠各肠段的吸收情况。各肠段区间划分如下:十二指肠段自幽门1 cm处开始;空肠段自幽门15 cm处开始;回肠段自盲肠上行20 cm处开始;结肠段从盲肠后端开始。不同肠段的 K_a 值和 P_{app} 值结果见表1。结果表明,结肠段的 K_a 值和 P_{app} 值与其他肠段比较显著减小($P<0.05$),十二指肠、空肠和回肠的 K_a 值和 P_{app} 值之间无显著性差异($P>0.05$)。说明积雪草苷的主要吸收窗在小肠,且小肠内无明显的特定吸收部位。

2.6.3 不同药物浓度对肠吸收的影响:用K-R液配制积雪草苷浓度为25、50、100 μg/mL的供试品溶液。取大鼠5只,以空肠段为灌流部位,依照2.6.1项下进行操作,考察药物浓度对肠吸收的影响,结果

见表2。结果表明,在25~100 μg/mL,不同药物浓度下的 K_a 值和 P_{app} 值差异无显著性($P>0.05$),说明积雪草苷在空肠段的吸收不受自身浓度的影响,主要以被动扩散机制进入体循环。

表1 积雪草苷在大鼠不同肠段的 K_a 和 P_{app} 值
($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 K_a and P_{app} of asiaticoside at various intestine segments in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

肠段	K_a/min^{-1}	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	0.029 8±0.004 3*	3.42±0.63*
空肠	0.036 5±0.007 6*	4.02±1.07*
回肠	0.033 5±0.008 1*	3.79±0.77*
结肠	0.007 0±0.001 5	1.72±0.43

与对结肠肠段组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs colon group

表2 不同浓度积雪草苷溶液在大鼠空肠段的 K_a 值和 P_{app} 值($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 K_a and P_{app} of asiaticoside in different concentration in jejunum of rats
($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	K_a/min^{-1}	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
25	0.003 27±0.000 77	3.85±0.67
50	0.003 65±0.000 76	4.02±1.07
100	0.003 78±0.000 97	4.15±1.28

3 讨论

3.1 据文献报道^[4],大鼠肠分泌液成分复杂,且随时间延长其分泌液成分量有增高的趋势,本实验采用HPLC法测定肠循环液中积雪草苷的量,且肠循环液中的其他组分不干扰积雪草苷的测定。

3.2 本研究采用重量法计算 K_a 和 P_{app} ,与加入非吸收性标示物(nonabsorbed marker)法相比,大大降低了检测的工作量,且可避免标示物本身对某些化合物的肠道转运或分析的干扰和放射性标示物对人体安全性影响。

3.3 积雪草苷在大鼠肠道内吸收较差,其原因可能是积雪草苷为三萜类大分子物质,不易透过生物膜。

3.4 不同药物浓度条件下,小肠的 K_a 值和 P_{app} 值无显著性差异,初步确定吸收机制为被动扩散。

参考文献:

- [1] 秦路平,庄卫国,郑汉臣,等.积雪草苷研究进展[J].国外医药:植物药分册,1997,12(4):154-157.
- [2] 聂淑芳,潘卫三,杨星钢,等.对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价[J].中国新药杂志,2005,14(10):1176-1179.
- [3] 聂淑芳,潘卫三,李伟,等.长春西汀的大鼠在体肠吸收研究[J].中国医药工业杂志,2005,36(10):625-628.
- [4] 游本刚,杨明世,范玉玲,等.尼群地平大鼠在体肠吸收动力学研究[J].中国药理学杂志,2004,39(3):214-217.

积雪草苷大鼠在体肠吸收动力学研究

作者：[黄怀鹏](#)，[刘彩霞](#)
作者单位：[河北平安健康集团, 河北, 石家庄, 050021](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(7)
被引用次数：6次

参考文献(4条)

1. [秦路平](#); [庄卫国](#); [郑汉臣](#) [积雪草苷研究进展](#) 1997(04)
2. [聂淑芳](#); [潘卫三](#); [杨星钢](#) [对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价](#)[期刊论文]-[中国新药杂志](#) 2005(10)
3. [聂淑芳](#); [潘卫三](#); [李伟](#) [长春西汀的大鼠在体肠吸收研](#)[期刊论文]-[中国医药工业杂志](#) 2005(10)
4. [游本刚](#); [杨明世](#); [范玉玲](#) [尼群地平大鼠在体肠吸收动力学研究](#)[期刊论文]-[中国药学杂志](#) 2004(03)

本文读者也读过(10条)

1. [尹丽娜](#), [王胜浩](#), [王虎根](#), [YIN Li-na](#), [WANG Sheng-hao](#), [WANG Hu-gen](#) [RP-HPLC测定积雪苷缓释片释放液中的2个指标成分](#)[期刊论文]-[中国现代应用药学](#)2008, 25(6)
2. [聂淑芳](#), [潘卫三](#), [杨星钢](#), [刘宏飞](#), [刘志东](#), [NIE Shu-fang](#), [PAN Wei-san](#), [YANG Xing-gang](#), [LIU Hong-fei](#), [LIU Zhi-dong](#) [对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价](#)[期刊论文]-[中国新药杂志](#)2005, 14(10)
3. [王佳哲](#), [张庆富](#) [小肠黏膜微循环的研究进展](#)[期刊论文]-[中国微循环](#)2008, 12(1)
4. [胡森](#), [夏斌](#), [黎君友](#), [陈廷秀](#), [段美丽](#), [张淑文](#), [HU Sen](#), [XIA Bin](#), [LI Jun-you](#), [CHEN Ting-xiu](#), [DUAN Mei-li](#), [ZHANG Shu-wen](#) [犬肠缺血/再灌注时小肠对早期肠内营养耐受能力的实验研究](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2006, 18(10)
5. [谢跃生](#), [潘桂湘](#), [高秀梅](#), [刘昌孝](#) [香加皮强心成分杠柳毒苷对大鼠小肠的吸收特性](#)[期刊论文]-[华北煤炭医学院学报](#)2007, 9(4)
6. [谭欣玮](#) [羟基积雪草苷在SD大鼠体内的药代动力学研究](#)[学位论文]2010
7. [黎继烈](#), [李宗敏](#), [钟海雁](#), [李忠海](#), [LI Ji-lie](#), [LIU Zong-min](#), [ZHONG Hai-yan](#), [LI Zhong-hai](#) [金柑总黄酮对小鼠胃肠吸收功能的影响](#)[期刊论文]-[中南林业科技大学学报](#)2007, 27(2)
8. [杨玉琴](#), [丁永辉](#), [夏玉凤](#), [Yang Yuqin](#), [Ding Yonghui](#), [Xia Yufeng](#) [积雪草活性成分的分析方法及药理作用研究进展](#)[期刊论文]-[中国野生植物资源](#)2010, 29(3)
9. [黄沛](#), [杨中林](#), [HUANG Pei](#), [YANG Zhong-lin](#) [不同纯度葛根素提取物的大鼠小肠吸收动力学研究](#)[期刊论文]-[海峡药学](#)2008, 20(3)
10. [张颖](#), [蒋学华](#), [ZHANG Ying](#), [JIANG Xue-hua](#) [汉防己甲素大鼠在体肠吸收机制研究](#)[期刊论文]-[中草药](#)2007, 38(2)

引证文献(6条)

1. [苏红](#), [王新春](#), [黄志巧](#), [吴培培](#) [单向灌流法研究异甘草素在大鼠体肠吸收](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2010(11)
2. [夏丽文](#), [董培良](#) [羟基积雪草苷在大鼠肠内吸收的研究](#)[期刊论文]-[药物评价研究](#) 2011(1)
3. [鲁萍](#), [王新春](#), [陈文](#), [尹俊涛](#) [单向灌流法研究叶黄素微囊的大鼠在体肠吸收](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2011(18)
4. [徐本亮](#), [王冰](#), [浦益琼](#), [陶建生](#), [蔡贞贞](#), [张彤](#) [丹皮酚平衡溶解度与油水分配系数测定及大鼠在体肠吸收研究](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2012(10)
5. [杨玉琴](#), [丁永辉](#), [夏玉凤](#) [积雪草活性成分的分析方法及药理作用研究进展](#)[期刊论文]-[中国野生植物资源](#) 2010(3)
6. [朱容慧](#), [赵军宇](#), [毕岳琦](#), [吴懿](#), [杨霞](#) [中药肠吸收动力学研究进展](#)[期刊论文]-[药物评价研究](#) 2010(1)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200807033.aspx