

复合吸收促进剂对葛根素肠吸收及毒性的影响

廖正根, 赖 珺, 梁新丽, 赵国巍, 张 萍*

(江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要:目的 考察吸收促进剂配伍对葛根素肠吸收的影响,并进一步观察复合吸收促进剂对肠黏膜的毒性。方法 运用外翻肠囊法,采用 $L_9(3)^4$ 正交设计试验考察各吸收促进剂的协同作用,确定较理想复合吸收促进剂;运用显微形态学观察复合吸收促进剂对肠黏膜的毒性。结果 复合吸收促进剂:1%壳聚糖、0.02%白芷挥发油、0.06%冰片配伍具有协同作用,可显著提高葛根素的肠吸收;复合吸收促进剂无肠黏膜毒性。结论 1%壳聚糖、0.02%白芷挥发油、0.06%冰片配伍可安全有效地促进葛根素的肠吸收。

关键词:葛根素;肠吸收;复合吸收促进剂

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1099-05

Effect of multi-combination absorption enhancer on puerarin intestinal absorption and its toxicity

LIAO Zheng-gen, LAI Jun, LIANG Xin-li, ZHAO Guo-wei, ZHANG Ping

(Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

Abstract : Objective To investigate the influence of the compatibility of absorption enhancers (AEs) on the intestinal absorption of puerarin and study the AEs' toxicities to the intestinal. **Methods** The *in vitro* everted intestinal sac was used as model. An orthogonal $L_9(3)^4$ test design was used to optimize a best multi-combination of AEs and investigate the synergistic effect of the optimized AEs on intestinal permeability of puerarin. And the AEs' toxicities were further studied by light microscopy. **Results** The results showed that a multi-combination which including 1% chitosan, 0.02% oil from *Radix Angelicae*, and 0.06% borneol had synergistic effect, which could significantly enhance the intestinal absorption of puerarin. And the multi-combination had no toxicities. **Conclusion** A multi-combination which including 1% chitosan, 0.02% oil from *Radix Angelicae Dahuricae*, and 0.06% borneol could safely and efficiently enhance the intestinal absorption of puerarin.

Key words: puerarin; intestinal absorption; multi-combination of absorption enhancers

生物药剂学分类系统 (BCS) 和 类疗效好的药物受肠低渗透性影响而生物利用度低,通常通过化学改造和加吸收促进剂的方法提高生物利用度。对于药剂工作者而言,加吸收促进剂的方法较常用,而目前单一吸收促进剂研究得较多,未见复合吸收促进剂的研究。葛根素药理作用广泛^[1,2],治疗心脑血管疗效好,但其溶解性和渗透性低导致口服生物利用度低。本实验以葛根素为模型药,主要从渗透性方面考察复合吸收促进剂配伍对其吸收的影响,同时从安全性角度考察复合吸收促进剂对肠黏膜的毒性作用,为进一步安全有效地使用吸收促进剂,提高药物肠吸收提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药:Agilent 1200 高效液相色谱仪

(美国 Agilent 公司);BS124S 型 Sartorius 电子分析天平;HH—CP 型 CO₂ 培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂);Sigma—18K 型高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司) 等。葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所);葛根素原料药 (河南省宛西制药股份有限公司);壳聚糖 (中国海德贝尔海洋生物技术有限公司);白芷挥发油 (自制);冰片 (南昌黄庆仁药店);甲醇 (Merk),流动相用水为双蒸水;其余试剂均为分析纯。

1.2 供试药液的配制

1.2.1 空白台氏液的组成:NaCl (138 mmol/L)、KCl (2.7 mmol/L)、CaCl₂ (2.0 mmol/L)、MgCl₂ (1.1 mmol/L)、NaH₂PO₄ (0.4 mmol/L)、NaHCO₃ (11.9 mmol/L)、D-葡萄糖 (11.0 mmol/L),不同

* 收稿日期:2008-12-01

基金项目:江西省自然科学基金资助项目 (2007GZY0932)

作者简介:廖正根(1967—),男,江西新余人,副教授,博士,硕士生导师,研究方向为药物新剂型与新技术。

Tel: (0791) 7119011 E-mail: lyzlyg@163.com

pH 的灌流液用 1.0 mol/L HCl 或 NaOH 调 pH。

1.2.2 含药台氏液:精密配制葛根素质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 台氏液,按照正交试验表,使用含药台氏液配制相应的含不同浓度、类别复合吸收促进剂。

1.3 实验动物:SD 大鼠,雄性,体质量 180 ~ 220 g,由江西中医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK (赣) 2005-0001。

1.4 色谱方法

1.4.1 色谱条件:色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , Agilent);流动相为甲醇-0.05% H₃PO₄ (30 : 70);检测波长为 250 nm;柱温为 30 ;体积流量:1.0 mL/min;进样量为 20 μL 。

1.4.2 标准曲线的制备:用空白台氏液将葛根素对照品配制成 24、49、982、1 964、4 910、9 820 ng/mL 的溶液,取 20 μL 进样,以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 回归,得回归方程: $Y = 83 X + 1.3257$ ($r = 0.9999$),质量浓度在 24 ~ 9 820 ng/mL 范围内线性关系良好。

1.4.3 方法专属性试验:考察空白台氏液对葛根素的检测是否有干扰。结果表明,本色谱条件下,空白台氏液对葛根素的测定无干扰,专属性良好。

1.4.4 重现性实验:连续进样 4.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素对照品溶液 20 μL 6 次,测定,得峰面积的 RSD 为 0.59%,结果表明测定的重现性良好。

1.4.5 空白台氏液对葛根素的化学降解:用空白台氏液配制葛根素药液各 3 份,于 (37 $\pm$ 0.5) 孵育 3 h,测定孵育前后的葛根素的质量浓度,计算得到 3 份葛根素药液孵育后葛根素质量浓度的剩余百分率分别为 99.3%、99.5%、99.7%,平均剩余百分率为 99.5%,可认为葛根素在空白台氏液中基本无化学降解。

1.5 外翻肠囊法:实验前将大鼠禁食过夜 (不禁水),用 3% 戊巴比妥钠 ip 麻醉。沿腹中线打开腹腔后,分别取出十二指肠、空肠、回肠和结肠各约 10 cm,置于冰浴的空白台氏液中,清洗后,用玻片去除肠系膜、脂肪。用小玻璃棒将肠段轻柔翻转,使小肠黏膜面向外,浆膜侧向内,结扎肠肛侧端,将肠段上端固定于取样口。用注射器从取样口处向肠内注满空白台氏液,作为受药体系。然后将其肠囊垂直放入含有 20 mL 含药台氏液的试管中,受药体系液面低于供液体系液面,将试管放入 CO₂ 培养箱孵育 1 h,温度 37 、5% CO₂,收集浆膜侧的液体测定^[3]。

1.6 统计处理:采用表观渗透系数 (P_{app}) 及 P_{app}

的提高倍数 (R_t) 评价吸收促进剂对葛根素在各肠段的吸收促进作用,组间显著性比较采用 SPSS 统计学软件进行比较, P_{app} 和 R_t 计算公示如下:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0}$$

$$R_t = P_{\text{app}} (\text{样品}) / P_{\text{app}} (\text{对照})$$

式中 dQ/dt 为单位时间内药物转运量, C_0 为供液体系中药物的质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), A 为肠面积 (cm^2), P_{app} (样品) 和 P_{app} (对照) 分别为有和无吸收促进剂的表现渗透系数

1.7 复合吸收促进剂配伍对葛根素的吸收促进作用:采用正交试验设计表 L₉ (3⁴),以壳聚糖、冰片和白芷挥发油为考察因素,各因素水平见表 1,以葛根素在各肠段的 P_{app} 为指标。按 1.5 项方法,考察各吸收促进剂配伍对葛根素各肠段吸收的影响,判断各吸收促进剂配伍使用是否对葛根素肠吸收具有协同作用。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 壳聚糖/ %	B 冰片/ %	C 白芷挥发油/ %
1	0	0	0
2	0.5	0.06	0.01
3	1.0	0.03	0.02

1.8 复合吸收促进剂肠毒性研究:按 1.5 项方法,将各孵育肠段分别同时置于台氏液、含复合吸收促进剂台氏液中,CO₂ 培养箱孵育 2 h,取出,放入 4% 福尔马林固定,60 温箱于不同浓度的乙醇溶液和二甲苯溶液中进行逐步脱水,石蜡包埋,切片,烤片,HE 染色,封片。光学显微镜 ($\times 200$) 下观察肠黏膜的形态变化,以目镜测微计测量肠上皮细胞的细胞核与膜间的距离 (NPA)^[4]、绒毛的长宽比 (Vi)。

2 结果

2.1 复合吸收促进剂配伍对葛根素吸收促进作用

2.1.1 正交试验研究:正交设计试验结果见表 2 和表 3。对葛根素在小肠 (十二指肠、空肠、回肠) 和结肠促吸收较理想的复合吸收促进剂分别为 A₃B₂C₃ 和 A₃B₂C₂,但药物的主要吸收窗为小肠,且复合吸收促进剂对空肠和回肠的促吸收效果优于结肠,所以确定较理想复合吸收促进剂为 A₃B₂C₃,即 1% 壳聚糖、0.06% 冰片及 0.02% 白芷挥发油。

2.1.2 复合吸收促进剂协同效应分析:通过正交实验结果分析十二指肠、空肠、回肠的 P_{app} 和 A、B、C 因素呈线性相关,结肠 P_{app} 和 3 种因素相关性不好,因此得到十二指肠、空肠、回肠 3 个线性回归方程分

表 2 正交设计试验结果

Table 2 Analysis of $L_9(3)^4$ test results

序号	A	B	C	空白	十二指肠		空 肠		回 肠		结 肠	
					$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1})$	Rt	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1})$	Rt	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1})$	Rt	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1})$	Rt
1	1	1	1	1	11.96		8.92		5.40		11.61	
2	1	2	2	2	11.14	0.9	13.84	1.6	14.16	2.6	16.27	1.4
3	1	3	3	3	14.81	1.2	14.82	1.6	16.21	3.0	14.89	1.3
4	2	1	2	3	13.04	1.1	16.07	1.8	18.61	3.5	17.01	1.5
5	2	2	3	1	18.42	1.5	21.14	2.4	21.04	3.9	11.56	1.0
6	2	3	1	2	13.00	1.1	13.55	1.5	12.67	2.4	7.49	0.7
7	3	1	3	2	16.41	1.4	19.37	2.2	25.90	4.8	22.10	1.9
8	3	2	1	3	17.60	1.5	18.41	2.1	22.74	4.2	16.74	1.4
9	3	3	2	1	18.16	1.5	18.38	2.1	23.23	4.3	16.92	1.5
十二指肠 P_{app}												
K ₁	37.91	41.41	42.56	48.54								
K ₂	44.46	47.16	42.34	40.55								
K ₃	52.17	45.97	49.64	45.45								
R	14.26	5.75	7.30	7.99								
空肠 P_{app}												
K ₁	37.58	44.36	40.88	48.44								
K ₂	50.76	53.39	48.29	46.76								
K ₃	56.16	46.75	55.33	49.30								
R	18.58	8.93	4.45	2.54								
回肠 P_{app}												
K ₁	35.77	49.91	40.81	49.67								
K ₂	52.32	57.94	56.00	52.73								
K ₃	71.87	52.11	63.15	57.56								
R	36.10	8.03	22.34	7.89								
结肠 P_{app}												
K ₁	42.77	50.72	35.84	40.09								
K ₂	36.06	44.57	50.20	45.86								
K ₃	55.76	39.30	48.55	48.64								
R	19.70	11.42	14.36	8.55								

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

误差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
十二指肠 P_{app}					
A	33.97	2	16.98	3.14	
B	6.14	2	3.07	0.57	
C	11.50	2	5.75	1.06	
误差	10.82	2	5.41		
空肠 P_{app}					
A	60.90	2	30.45	54.73	$P < 0.05$
B	14.59	2	7.30	13.12	
C	34.81	2	17.40	31.28	$P < 0.05$
误差	1.11	2	0.56		
回肠 P_{app}					
A	217.70	2	108.85	20.64	$P < 0.05$
B	11.48	2	5.74	1.09	
C	86.77	2	43.38	8.22	
误差	10.55	2	5.27		
结肠 P_{app}					
A	66.87	2	33.44	5.27	
B	21.78	2	10.89	1.72	
C	41.16	2	20.58	3.25	
误差	12.68	2	6.34		

别为： $P_{app} = 17.322 C + 0.099 A \times B + 0.012, P_{app} = 0.083 B + 42.879 A \times C + 0.011, P_{app} = 0.013 A + 39.945 C + 0.008$,从回归方程中可见复合吸收促进剂配伍对葛根素肠吸收具有协同促进作用。当壳聚糖分别和冰片、白芷挥发油配伍时,对葛根素分别在十二指肠、空肠的吸收具有协同促进作用。但比较 3 个回归方程中各因素的系数,可见 C 的系数均较大,说明 C 因素对 P_{app} 的影响较大;关于空肠 P_{app} 的回归方程,A $\times$ C 的系数较大,说明 A、C 两因素的协同作用较大。

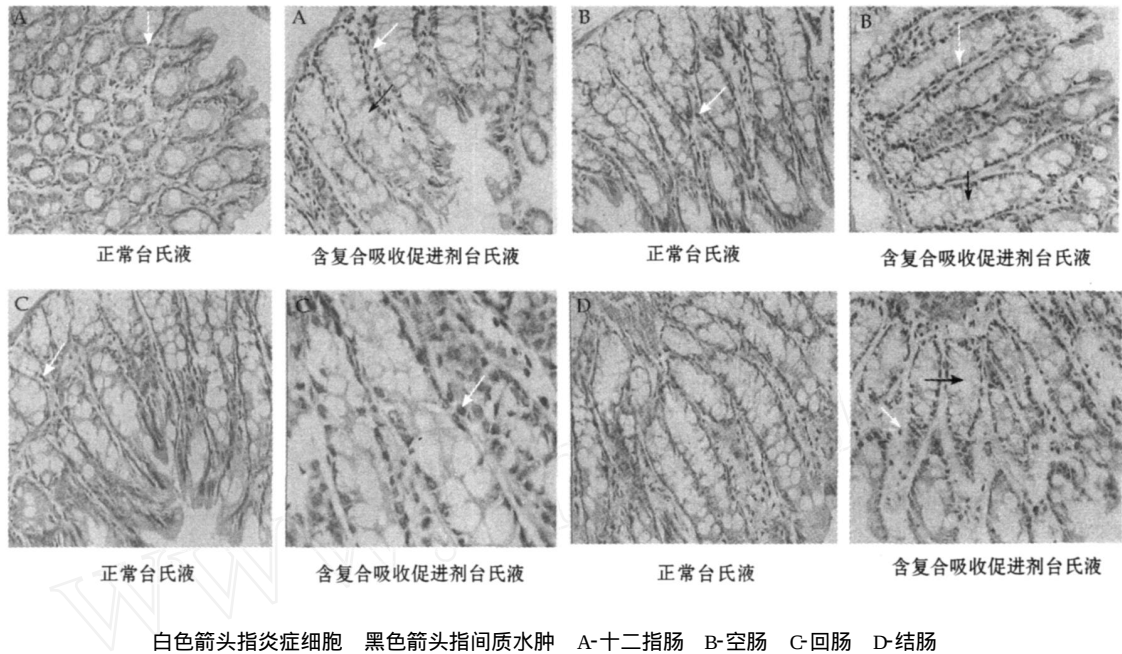
2. 1. 3 复合吸收促进剂最佳处方验证:将筛选出的较理想的复合吸收促进剂按 1.5 项方法验证,结果显示最佳处方对葛根素具有显著的吸收促进作用,葛根素在十二指肠、空肠、回肠以及结肠的 P_{app} 分别为 0.019 86、0.024 50、0.029 83 和 0.016 74 cm/h,分别可提高到 1.8、3.0、5.6 和 1.6 倍。

2. 2 吸收促进剂肠毒性研究:按 1.8 项方法进行实验,分别观察经台氏液以及含最佳配比复合吸收促

进剂台氏液孵育后的肠黏膜形态变化,判断优选的复合吸收促进剂对大鼠肠黏膜的毒性,结果见图 1。

经空白台氏液孵育的肠上皮黏膜形态完整,细胞间质无水肿,边缘绒毛无脱落现象,但存在少量炎症细胞,可能是肠上皮黏膜在处理 and 制备过程中受

轻微损伤。观察含复合吸收促进剂台氏液孵育后的肠上皮黏膜时,可见有轻微间质水肿,肠绒毛缩短,同时也存在少量炎症细胞,但形态变化轻微。两种溶液孵育后的肠上皮细胞的 NPA 几乎无变化,Vi 有轻微减小。结果见表 4。



White arrowhead indicates inflammatory cell black arrowhead indicates interstitial edema A-duodenum B-jejunum C-ileum D-colon

图 1 各肠段在不同溶液中培养 2 h 后的形态学变化

Fig. 1 Morphological change of every intestinal segment after incubation for 2 h in different solutions

表 4 复合吸收促进剂对肠黏膜 NPA 和 Vi 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 4 Effect of multi-combination of AEs on NPA and Vi of intestinal mucosa ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组 别	Vi				NPA/ μm			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠	十二指肠	空肠	回肠	结肠
正常台氏液	4.18 $\pm$ 0.21	4.35 $\pm$ 0.23	4.05 $\pm$ 0.18	4.29 $\pm$ 0.22	1.80 $\pm$ 0.14	2.05 $\pm$ 0.15	1.90 $\pm$ 0.14	2.00 $\pm$ 0.13
含复合吸收促进剂台氏液	3.88 $\pm$ 0.12	3.98 $\pm$ 0.13	3.82 $\pm$ 0.15	3.94 $\pm$ 0.10	1.65 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.15	1.65 $\pm$ 0.16	1.75 $\pm$ 0.13

3 讨论

单一吸收促进剂用于药物促吸收方面较普遍,复合吸收促进剂配伍使用未见报道。本实验已筛选出对葛根素具有吸收促进作用的促进剂壳聚糖、冰片和白芷挥发油,得出 0.5 % 壳聚糖、1 % 壳聚糖和 0.06 % 冰片对葛根素在回肠 P_{app} 分别可提高到 3.0、3.0 和 2.5 倍;0.01 % 白芷挥发油对葛根素在十二指肠 P_{app} 可提高到 1.6 倍;但它们对空肠和结肠的促吸收效果均不明显。而较理想复合吸收促进剂对葛根素在十二指肠、空肠、回肠以及结肠的 P_{app} 分别可提高到 1.8、3.0、5.6 和 1.6 倍。实验结果显示复合吸收促进剂配伍使用对葛根素的吸收促进作用优于单一吸收促进剂。同时所得的 3 个回归方程也显示复合吸收促进剂配伍具有协同作用。

葛根素吸收低下的一个原因是由于 P-糖蛋白

(P-gp) 外排活动^[5], P-gp 外排活动在大鼠胃肠道的不同部位排出活性存在着明显的差异,顺序为回肠 > 空肠 > 结肠^[6]。本实验结果显示,加入吸收促进剂后,葛根素在各肠段 P_{app} 提高倍数顺序为回肠 > 空肠 > 结肠。这一实验结果提示,抑制 P-gp 外排活动可能是复合吸收促进剂促进葛根素吸收的一个重要原因。

壳聚糖已被公认为无毒的食品添加剂,其对药物跨上皮黏膜细胞的透过能力有很强的促进作用^[7]。冰片也是一种常用的吸收促进剂,其作用机制为使细胞膜上的磷脂双分子层运动更加有序,使膜的通透性增加,从而有利于药物吸收^[8,9],同时冰片对外排 P-gp 活性存在抑制作用^[10]。两者吸收机制不同可能存在协同作用。前期工作证明白芷挥发油有吸收促进作用,其促进吸收机制尚待进一步研

究,可能是通过改变生物膜的理化性质和生理结构,如脂水分配系数等。将 3 种吸收促进剂配伍,结果壳聚糖分别和冰片、白芷挥发油都有协同作用,冰片和白芷挥发油无协同作用,说明壳聚糖和白芷挥发油的促吸收机制可能不同,冰片和白芷挥发油的促吸收机制可能相同或冰片用量较文献报道的少,所以作用不明显。总之,复合吸收促进剂配伍产生协同作用的原因有待进一步研究。

由于壳聚糖和冰片已是公认的无毒吸收促进剂,但关于白芷挥发油作为吸收促进剂和吸收促进剂配伍使用对肠黏膜的毒性未见报道,所以本实验从安全性角度出发,进一步考察复合吸收促进剂对肠黏膜的毒性。NPA 是细胞形态的重要参数,当吸收促进剂作用于肠黏膜时,NPA 值会不同程度的减少,从而反映吸收促进剂对肠黏膜的毒性。 V_i 值通常反映肠黏膜绒毛形态的变化,当有毒物质接触肠上皮黏膜时,绒毛皱缩,长度减小, V_i 也减小。本实验复合吸收促进剂配伍使用与台氏液比较,对 NPA 和肠绒毛影响小,NPA 和 V_i 值无显著变化,说明复合吸收促进剂配伍对肠黏膜无毒性作用。

参考文献:

- [1] 李娟,胡永华. 葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞周期和相关周期蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1535-1537.
- [2] 黄萍,龚永生,范小芳,等. 葛根素对低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室 Apelin/APJ 系统的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 565-569.
- [3] Yu L L, Huang J D. Effects of sodium deoxycholate and sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats [J]. *Bioch Pharmacol*, 2000, 59: 665-672.
- [4] Polentarutti B L, Peterson A L, Sjöberg A K, et al. Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the using chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics [J]. *Pharm Res*, 1999, 16: 446-454.
- [5] 崔升森. 葛根素体内药动学及葛根黄酮自微乳化胶囊的研究 [C]. 沈阳:沈阳药科大学, 2004.
- [6] Stephens R H, O'heill C A, Warhurst A, et al. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296: 584-591.
- [7] 张峻颖,黄罗生. 壳聚糖及其衍生物在促进药物口服吸收中的应用 [J]. 海峡药学, 2004, 16(2): 24-27.
- [8] 樊岚岚,唐由之,卢景,等. 冰片对兔角膜上皮细胞膜促渗透作用的实验研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 1998, 8(2): 67-69.
- [9] 陈新梅,朱家璧,孙卫东,等. 吸收促进剂对人参皂苷 Rg1 鼻腔吸收的促进作用及鼻腔毒性 [J]. 药学报, 2006, 41(2): 149-155.
- [10] 李东晓,邓文龙. 冰片促透作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 87-89.

没药挥发油对大鼠神经胶质瘤细胞体外增殖的抑制作用

李舍予¹,田报春¹,张勇刚¹,王海龙²,景璐璐¹,莫显明^{1*}

(1. 四川大学华西临床医学院华西医院 生物治疗国家重点实验室,四川 成都 610041;

2. 四川大学化工学院,四川 成都 610065)

摘要:目的 探讨没药挥发油(没药油)对大鼠神经胶质瘤细胞 C6 增殖抑制作用。方法 应用 MTT 法检测不同质量浓度没药油对 C6 细胞活性的作用;BrdU 掺入试验检测细胞增殖的变化;流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 没药油对 C6 细胞活性有明显的抑制作用,其抑制率与质量浓度有关;没药油作用 24 h 后,C6 细胞 BrdU 标记指数明显降低;而不同质量浓度没药油作用 24 h 后,C6 细胞凋亡率与对照组相比无显著改变。结论 没药油对大鼠神经胶质瘤细胞株 C6 的增殖具有明显的抑制作用,但诱导细胞凋亡的作用不明显。

关键词:没药;没药油;神经胶质瘤;增殖;凋亡

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1103-04

神经胶质瘤是常见颅内原发性肿瘤,对一般化学治疗均不敏感。尽管各种治疗手段不断提高,患者平均生存期仍不足 1 年。中国传统医学在治疗胶质瘤上有着悠久的历史,其中没药是各种治疗方剂中的重要组成药物之一。没药是橄榄科植物没药树

Commiphora myrrha Engl. 或爱伦堡没药树 *Balsamodendron ehrenbergianum* Berg. 树皮渗出的树脂,含有挥发油、树脂、树胶等成分,有散血去瘀、消肿定痛等功效^[1]。Shoemaker 等^[2]发现利用中医传统的煎药方法制作的没药水提取物对 8 种肿

* 收稿日期:2008-10-22

基金项目:四川大学大学生创新性实验计划重点项目(2007055)

作者简介:李舍予(1985—),男,满族,天津市人,八年制医学博士在读,主要从事中药肿瘤药理及多基因遗传病发病机制的研究。

E-mail: lisheyu@gmail.com

*通讯作者 莫显明 Tel: (028) 85164017 Fax: (028) 85164047 E-mail: xmingmo@scu.edu.cn