

冰片及石菖蒲促进羟基红花黄色素 A 透过血脑屏障的实验研究

吴雪^{1,2,3}, 欧阳丽娜^{1,3}, 向大位^{1,3}, 向大雄^{1,3*}

1. 中南大学湘雅二医院 湖南省中药制剂新技术重点实验室, 湖南 长沙 410011

2. 北京积水潭医院, 北京 100035

3. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 考察芳香开窍药冰片及石菖蒲对羟基红花黄色素 A (HSYA) 血脑屏障 (BBB) 通透性的影响。方法 ig 给予大鼠 20.00 mg/kg HSYA 混悬液, 分别配伍冰片及石菖蒲水提液, 给药后采集大鼠血浆及脑组织。HPLC 测定大鼠血浆及脑组织内 HSYA 浓度, 以各组 HSYA 的 AUC_{0-8h}/AUC_{0-8h} 为评价指标, 进行冰片及石菖蒲对 BBB 通透性影响的评价。结果 HSYA、HSYA+冰片、HSYA+石菖蒲组 HSYA 在大鼠血浆及脑匀浆中的 AUC_{0-8h} 分别为 $(77\ 228.76 \pm 2\ 873.19)$ 、 $(81\ 949.04 \pm 2\ 283.11)$ 、 $(28\ 479.63 \pm 2\ 431.71)$ ng·mL⁻¹·min 及 $(55\ 925.0 \pm 2\ 434.28)$ 、 $(82\ 768.53 \pm 3\ 277.00)$ 、 $(70\ 914.29 \pm 2\ 900.71)$ ng·mL⁻¹·min, 各组 AUC_{0-8h}/AUC_{0-8h} 分别为 0.72、1.01、2.49。结论 HSYA 配伍冰片及石菖蒲后, AUC_{0-8h}/AUC_{0-8h} 均显著升高 ($P < 0.05$)。冰片及石菖蒲均对 BBB 有开启作用, 且石菖蒲可影响 HSYA 在大鼠体内的分布。

关键词: 冰片; 石菖蒲; 羟基红花黄色素 A; 血脑屏障; 芳香开窍药

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0734-04

Enhancing effect of *Borneolum Syntheticum* and *Acori Talarinowii Rhizoma* on penetrating blood-brain barrier of hydroxysafflor yellow A

WU Xue^{1,2,3}, OUYANG Li-na^{1,3}, XIANG Da-wei^{1,3}, XIANG Da-xiong^{1,3}

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, Hunan Province, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

2. Beijing JiShuiTan Hospital, Beijing 100035, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To investigate the enhancing effect of *Borneolum Syntheticum* and *Acori Talarinowii Rhizoma* on penetrating blood-brain barrier (BBB) of hydroxysafflor yellow A (HSYA) in rat. **Methods** The concentration of HSYA in rat plasma and brain was determined after ig administration of 20.00 mg/kg of HSYA to rats with or without *Borneolum Syntheticum* and *Acori Talarinowii Rhizoma*. And then, the character of penetrating BBB through the result of the AUC_{brain}/AUC_{blood} was evaluated. **Results** The AUC_{0-8h} were $(77\ 228.76 \pm 2\ 873.19)$, $(81\ 949.04 \pm 2\ 283.11)$, and $(28\ 479.63 \pm 2\ 431.71)$ ng·mL⁻¹·min for blood and $(55\ 925.0 \pm 2\ 434.28)$, $(82\ 768.53 \pm 3\ 277.00)$, and $(70\ 914.29 \pm 2\ 900.71)$ ng·mL⁻¹·min for brain of the control group, *Borneolum Syntheticum* group, and *Acori Talarinowii Rhizoma* group. The AUC_{brain}/AUC_{blood} were 0.72, 1.01, and 2.49, respectively. **Conclusion** *Borneolum Syntheticum* and *Acori Talarinowii Rhizoma* do enhance the penetrating BBB of HSYA ($P < 0.05$). Further more, *Acori Talarinowii Rhizoma* could affect the distribution of HSYA in rats.

Key words: *Borneolum Syntheticum*; *Acori Talarinowii Rhizoma*; hydroxysafflor yellow A (HSYA); blood-brain barrier (BBB); drug of resuscitation with aromatics

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的特殊结构使 98% 治疗脑部疾病的药物难以进入脑部^[1-2]。许多学者认为, 药物可以依靠中药“药引子”使其

直接透过 BBB 实现脑部靶向治疗^[3-5]。中药芳香开窍类药物如冰片、石菖蒲等大都有“开窍于脑”的功效。动物实验证明芳香开窍药可以透过 BBB, 并

收稿日期: 2010-07-14

作者简介: 吴雪 (1984—), 女, 北京人, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂新剂型与新技术研究。

Tel: (0731)85292093 E-mail: wuxue_1209@163.com

*通讯作者 向大雄 Tel: (0731)85292093 E-mail: xiangdaxiong@163.com

提高其他药物的脑内浓度^[6]。

红花是一味传统的活血祛瘀中药,来源为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的花。研究表明红花的主要活性成分羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA) 具有抗血小板聚集、减轻心脑血管缺血损伤等作用^[7-14]。目前国内外报道中,未见脑组织内 HSYA 浓度的测定方法以及 HSYA 的 BBB 透过性考察。本实验首次考察了冰片及石菖蒲对 HSYA 透过 BBB 的影响,为芳香开窍药引经入脑,可作脑靶向载体提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂

HSYA(批号 06/090227,质量分数>98%,上海施丹德生物技术有限公司),对羟基苯甲醛(批号 110715-200212,中国药品生物制品检定所,供定量测定用),乐坦(注射用红花黄色素,批号 090205,规格 50 mg,含 HSYA 35.00 mg/支,浙江永宁药业股份有限公司),冰片、石菖蒲(购于老百姓大药房,经中南大学药学院李劲平副教授鉴定),乙腈、甲醇(色谱纯,Merck,德国),磷酸(化学纯,天津市大茂化学仪器供应站),水(娃哈哈纯净水)。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1200 系列),AG285 电子分析天平(METTER-TOLEDO,瑞士),真空旋转挥干机(Thermo,美国),TG16—W 微量高速离心机(赛特湘仪离心机仪器有限公司),WH—2 微量旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Luna 5u C₁₈ (2) 100 A (250 mm×4.60 mm, 5 μm),流动相为 0.05%磷酸-乙腈(80:20),体积流量 0.80 mL/min,柱温 40 °C,检测波长 403 nm(HSYA)、250 nm(IS)。

2.2 动物分组、给药及指标测定

2.2.1 动物分组 雄性 SD 大鼠(SCXK 2007-0005,中南大学实验动物中心)适应性喂养 1 周后,称体质量。随机分为 3 组:HSYA 组、HSYA 配伍冰片组、HSYA 配伍石菖蒲组,每组 6×11 只。

2.2.2 给药剂量确定及药物制备 按照《中国药典》2005 版规定中等剂量,按体表面积法折算为大鼠实验剂量:冰片 28.00 mg/kg、石菖蒲 3.00 mg/kg、HSYA 20.00 mg/kg。石菖蒲提取液的制备:石菖蒲加蒸馏

水浸泡 30 min,加热蒸馏,收集挥发油水混合溶液,加入适量聚山梨酯 80(终体积分数 1%)充分混匀,蒸馏水定容,得到生药 3.00 g/mL 的石菖蒲溶液。各组均配制成 0.80%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)混悬液。

2.2.3 样品采集 大鼠适应性喂养 1 周后,实验前 1 d 禁食 12 h。3 组实验动物分别 ig 20.00 mg/kg HSYA 混悬液、20.00 mg/kg HSYA+28.00 mg/kg 冰片的混悬液、20.00 mg/kg HSYA+3.00 g/kg 石菖蒲的混悬液。给药后,分别于 10、20、30、45 min 和 1、1.5、2、3、6、8、12 h 摘除眼球采血,肝素抗凝。并立即在冰台上快速取大鼠脑组织,剥离软脑膜,生理盐水洗净,滤纸吸干表面水分,称质量,装入冻存管中,于-70 °C 冰箱保存。

2.2.4 样品处理 取血浆 500 μL 及 45 μL 内标(对羟基苯甲醛,20.30 μg/mL)于 2 mL EP 管中。加入 1.5 mL 甲醇,立即涡旋混匀 2 min,12 000 r/min 离心 15 min。取上清 1.5 mL 于真空挥干机 40 °C 挥干。100 μL 流动相溶解混匀,取 20 μL 进样。定量称取脑组织,以脑组织-生理盐水(1:3)匀浆。脑组织匀浆液处理方法同血浆样品处理。

2.3 数据处理

以 SPSS 11.5 统计软件分析处理,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 方法学考察

在本实验测定条件下,血浆及脑组织内 HSYA 均与内标和内源性物质分离良好。HSYA 和内标的出峰时间分别为 6、12 min。在 0.04~2.00 μg/mL 线性内,血浆及脑组织 HSYA 的标准曲线方程分别为: $Y=0.0004X+0.0117$ ($r^2=0.9949$)、 $Y=0.0006X+0.0004$ ($r^2=0.9988$),最低定量限均为 40.00 ng/mL。血浆及脑组织内 HSYA 的萃取回收率分别为 85.07%~93.22%、83.49%~89.64%;日内精密度 RSD 分别为 5.85%~11.20%、2.02%~5.13%;日间精密度 RSD 分别为 5.34%~8.15%、1.93%~9.14%。以上数据表明,该方法可以有效测定大鼠血浆及脑组织中 HSYA 的浓度。

3.2 动物实验结果

大鼠血浆及脑组织内 HSYA 平均药物浓度-时间曲线见图 1、2。HSYA 大鼠体内药动学参数见表 1。

4 讨论

4.1 样品处理方法考察

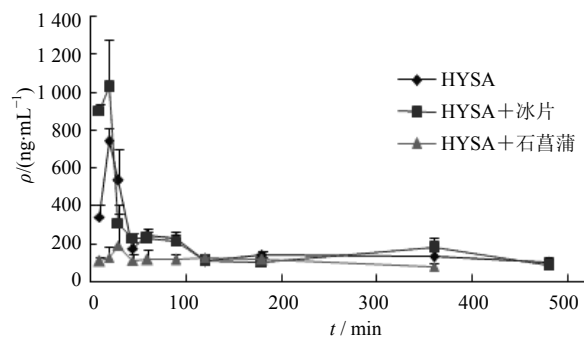


图 1 HSYA 在大鼠血浆中药-时曲线
Fig. 1 Mean plasma concentration-time curves of HSYA in rats

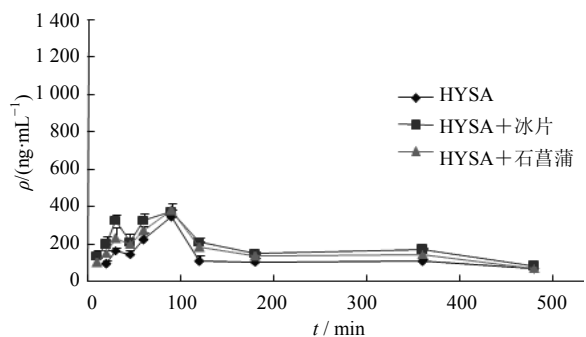


图 2 HSYA 在大鼠脑组织内药-时曲线
Fig. 2 Mean brain concentration-time curves of HSYA in rats

表 1 HSYA 在大鼠体内药动学参数
Table 1 *In vivo* pharmacokinetic parameters of HSYA in rats

参 数	单 位	HSYA	HSYA+冰片	HSYA+石菖蒲
$t_{\max}$ (血)	min	20	20	30
$C_{\max}$ (血)	ng·mL ⁻¹	739.39±6.86	1 024.77±16.63	188.52±8.35
AUC _{0-8 h} (血)	ng·mL ⁻¹ ·min	77 228.76±2 873.19	81 949.04±2 283.11	28 479.63±2 431.71*
$t_{\max}$ (脑)	min	90	90	90
$C_{\max}$ (脑)	ng·mL ⁻¹	342.50±7.54	372.50±16.12	377.50±11.50
AUC _{0-8 h} (脑)	ng·mL ⁻¹ ·min	55 925.00±2 434.28	82 768.53±3 277.00*	70 914.29±2 900.71*
AUC _脑 /AUC _血		0.72±0.044	1.01±0.054*	2.49±0.082*

与 HSYA 比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs HSYA

固相萃取技术是目前常用的生物样品前处理方法,然而 HSYA 为水溶性成分,在两种常用固相萃取柱(Strata™-X, Phenomenex; Cleanert PEP-SPE, Agela Technologies Inc.)上考察均没有保留,故采取常用的固相萃取方法不可行。蛋白沉淀法是快速、简便的样品前处理方法,甲醇和乙腈均为常用的蛋白沉淀剂。经考察,采用 3 倍量甲醇进行蛋白沉淀样品回收率最高,内源性杂质去除效果最好。

4.2 样品测定方法的考察

本实验考察了 HSYA 在串联质谱条件下的测定方法。但由于 HSYA 的结构特点,在质谱条件下母离子峰和子离子峰均很弱。与 HPLC 法相比较,并没有明显优势,故最终采用 HPLC 法对 HSYA 进行测定。

4.3 冰片具有促透作用

配伍冰片后,HSYA 在血浆及脑组织内 $C_{\max}$ 均升高, $AUC_{\text{脑}}/AUC_{\text{血}}$ 明显增加 ($P<0.05$)。推断冰片不仅可以促进 HSYA 吸收入血,还可以促进 HSYA 透过 BBB 进入脑内,开启 BBB。

陈艳明等^[15]证实 BBB 的开放在 ig 冰片 4 h 后

细胞间紧密连接被打开。刘娜等^[16]证实,冰片改善 BBB 通透性的作用,6 h 时作用最明显。实验结果显示,ig 冰片后 2 h 药物脑内浓度/血浆内浓度为最大值。因此,本实验证实 ig 冰片 2 h 后通过可逆性的打开大鼠脑血管内皮细胞间的紧密连接而开启大鼠 BBB。

4.4 石菖蒲提取液促进 HSYA 透过 BBB

配伍石菖蒲提取液后,HSYA 在血浆内 $t_{\max}$ 推迟,且 $C_{\max}$ 及 $AUC_{0-8 h}$ 减小。黄可儿等^[17]实验证实,石菖蒲挥发油成分对肠道平滑肌正常运动有明显的抑制作用。推测石菖蒲提取液由此延缓了 HSYA 在胃肠道的吸收。而 HSYA 在脑组织内 $C_{\max}$ 及 $AUC_{0-8 h}$ 升高, $AUC_{\text{脑}}/AUC_{\text{血}}$ 于对照组以及配伍冰片组相比均明显增加 ($P<0.05$)。推断石菖蒲改变了黄酮类成分 HSYA 的分布,并可有效开启 BBB。

在 ig 石菖蒲提取液 1.5 h 时,HSYA 在大鼠脑内浓度/血浆内浓度为最大值。因此,石菖蒲提取液 ig 给予大鼠 1.5 h 后开启 BBB。

4.5 结论

本实验证实,芳香开窍药冰片及石菖蒲均可提

高 HSYA 的 BBB 透过率。推断芳香开窍药可作为 HSYA 的脑靶向载体引经入脑。然而芳香开窍药以何种机制引导其他药物进入脑部,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Weissa N, Millera F, Cazaubon S. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(4): 842-857.
- [2] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [3] 谢志慧, 熊耀康. 中药靶向制剂研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 562-564.
- [4] 武密山, 赵素芝. 引经药是方剂靶向疗效的载体 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(5): 11-13.
- [5] 肖玉强, 张良玉, 唐海涛, 等. 冰片促进砷剂透过血脑屏障实验研究 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 6(3): 244-246.
- [6] 陈艳艳, 才丽平. 芳香开窍类中药含药脑脊液对星形胶质细胞水通道-4 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(12): 1783-1786.
- [7] 张岭, 宋艳, 李长龄, 等. 羟基红花黄色素 A 对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 90-93.
- [8] 陈亭亭, 杜玉娟, 刘晓雷, 等. 羟基红花黄色素 A 对脑缺血大鼠皮层炎症信号转导途径相关因子的抑制作用 [J]. 药学报, 2008, 43(6): 570-575.
- [9] 裴崇强, 孙春燕, 金鸣. 注射用红花黄色素缓解油酸诱导的大鼠急性肺损伤作用 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 596-601.
- [10] 金鸣, 董宁宁, 吴伟, 等. 羟基红花黄色素 A 缓解大鼠心肌细胞凋亡作用的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 924-930.
- [11] 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲, 等. 高效液相色谱法测定红花中的羟基红花黄色素 A [J]. 色谱, 2003, 21(6): 593-595.
- [12] Zhu F B, Zhang L, Wang Z H, et al. Therapeutic effects of hydroxysafflor yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms [J]. *Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(4): 607-613.
- [13] 梁辉, 范金英, 李爱华, 等. 羟基红花黄色素 A 对大鼠局灶性脑缺血再灌注 NMDAR₁ 蛋白表达的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, 6(3): 194-196.
- [14] 吴伟, 金鸣, 朴永哲, 等. 红花黄色素缓解大鼠心肌缺血的作用 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1373-1375.
- [15] 陈艳明, 王宁生. 冰片对 P-糖蛋白的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(2): 96-99.
- [16] 刘娜, 高祥春. 冰片可控性开放血脑屏障的实验研究 [J]. 潍坊医学院学报, 2007, 92(5): 398-400.
- [17] 黄可儿, 柯雪红, 王丽新, 等. 肠炎灵片挥发油对胃肠功能的影响 [J]. 广西中医药, 2003, 26(5): 48-49.