

冰片对葛根素透过体外模拟血脑屏障的影响

杨 乐^{1,2,3}, 吴军勇^{1,2,3}, 胡雄彬^{1,2,3}, 向大雄^{1,2,3*}

1. 中南大学湘雅二医院 药学部, 湖南 长沙 410011

2. 湖南省中药制剂新技术重点实验室, 湖南 长沙 410011

3. 中南大学临床药学研究所, 湖南 长沙 410011

摘要:目的 运用小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd.3)制备血脑屏障(BBB)模型,探讨冰片对葛根素透过BBB的影响并初步探讨冰片促进BBB开放的主要途径。方法 MTT实验考察不同浓度冰片和葛根素对bEnd.3细胞的毒性作用,筛选实验药物浓度。应用BBB体外模型,以跨内皮细胞间电阻作为紧密连接程度的主要反应指标,观察冰片对其紧密连接的开放有无直接影响以及冰片对葛根素跨BBB转运的影响。结果 经MTT实验确定冰片和葛根素的实验药物浓度均为50 $\mu\text{mol/L}$ 。各组给药前与给药24 h后跨膜电阻(TEER)未见明显改变,葛根素组、冰片+葛根素组透过率分别为(59.96 $\pm$ 5.90)%和(106.80 $\pm$ 2.73)%,差异显著($P<0.05$)。结论 冰片联合葛根素用药可以一定程度上促进葛根素透过BBB,但其开窍机制还需通过细胞的相关紧密连接蛋白水平和腺苷受体信号通路进一步探讨。

关键词: 冰片; 葛根素; 血脑屏障; 透过率; 跨膜电阻

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3408-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.025

Effect of borneol on puerarin through *in vitro* blood-brain barrier

YANG Le^{1,2,3}, WU Jun-yong^{1,2,3}, HU Xiong-bin^{1,2,3}, XIANG Da-xiong^{1,2,3}

1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

2. Key Laboratory for New Technology of Chinese Medicine Preparations of Hunan Province, Changsha 410011, China

3. Institute of Clinical Pharmacy, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: Objective To investigate the effect of borneol on puerarin through *in vitro* blood-brain barrier (BBB) model and to discuss the main pathway of borneol to promote the opening of BBB. **Methods** MTT assay was conducted to investigate the toxic effects of borneol and puerarin with different concentration on the cells and to screen the concentration of tested drug. *In vitro* model of BBB was used to observe the effect of borneol on the opening of tight junction and the effect of borneol on puerarin through BBB. **Results** The experimental drug concentration of borneol and puerarin was both 50 $\mu\text{mol/L}$ by MTT experiment. There was no significant change in transepithelial electrical resistance (TEER) before administration and 24 h after administration, and the permeation rate of puerarin group and borneol + puerarin group were (59.96 $\pm$ 5.90)% and (106.80 $\pm$ 2.73)%, respectively, with significant difference between two groups. **Conclusion** Borneol combined with puerarin can promote its permeation rate to a certain extent, but its mechanism needs to be further explored by cell-related tight junction proteins level and adenosine receptor signaling pathway.

Key words: borneol; puerarin; blood-brain barrier; permeation rate; transepithelial electrical resistance

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的特殊结构使得98%的治疗脑部疾病的药物难以进入脑部^[1]。现代研究表明,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^[2-3]。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,并提高其他药物的脑内浓度^[4]。

由于在体条件对BBB的影响因素较复杂,不易观察冰片对BBB的作用机制,故本实验利用BBB体外模型观察冰片对BBB的直接影响,探讨冰片

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573718)

作者简介: 杨 乐(1992—),女,在读硕士,研究方向为中药制剂新剂型与新技术。Tel: 13873183242 E-mail: yangle674958368@163.com

*通信作者 向大雄(1969—),男,博士生导师,教授,研究方向为中药制剂新剂型与新技术。Tel: (0731)85292093 E-mail: xiangdaxiong@163.com

对葛根素透过 BBB 的影响以及冰片促进 BBB 开放的主要途径。以期揭示冰片的“开窍”机制,同时为冰片的配伍组方提供药理学研究基础。

1 材料

1.1 细胞

小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd.3)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品、试剂与耗材

DMEM 培养基、胰蛋白酶、进口胎牛血清(FBS)、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)、100 U/mL 青-链霉素双抗, Gibco 公司; 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO), Sigma 公司; 96 孔细胞培养板、12 孔 Transwell 细胞培养板(0.4 μm), Corning 公司; 冰片(批号 110743-200905, 中国食品药品检定研究院, 供定量测定用, 质量分数 $\geq 98\%$); 葛根素(批号 STA-04306018, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海诗丹德生物技术有限公司)。

1.3 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); EVOM2 细胞电位仪(WPI 公司); 多功能酶标仪(Thermo 公司); 倒置显微镜(Nikon 公司)。

2 方法

2.1 小鼠 bEnd.3 细胞的培养与冻存

用 DMEM 高糖培养基(含 15% FBS、1% 100 U/mL 青-链霉素)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95%湿度、5% CO_2 恒温培养箱内培养, 隔天换液, 待细胞在培养瓶内长至约 80%融合时用 0.25%胰酶消化, 并按 1:2 比例传代。预先配制冻存液(10% DMSO 与 90% FBS 混合液), 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存预冷。取对数生长期细胞, 弃去培养瓶内的培养基, 预温的 PBS 洗涤 3 次, 0.25%胰酶消化细胞, 在显微镜下观察, 待细胞微变圆形时加入新鲜预温的培养基终止消化, 吹散细胞, 将细胞悬浮液离心, 弃去培养基, 将预冷的冻存液加入细胞沉淀中并重新悬浮细胞, 每支冻存管加入 1 mL 冻存液, 密封后标记, 冻存降温梯度: 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; 20 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; 80 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; 冻存后保存于液氮罐中。

2.2 MTT 法检测冰片和葛根素的细胞毒性

分别精密称取 1.5 mg 冰片、4.2 mg 葛根素, 分别溶于 1 mL DMSO 中, 配制成浓度为 10 mmol/L 的母液。精密吸取适量母液加入无血清 DMEM 培养基进行梯度稀释, 分别得到终浓度为 0、0.000 5、0.005、0.05、0.5、5、50、500 $\mu\text{mol/L}$ 的冰片和葛

根素溶液, 其中 DMSO 体积分数 $<0.1\%$ 。所有药物溶液均采用 0.22 μm 微孔滤膜除菌。

取对数生长期的 bEnd.3 细胞, 0.25%胰酶消化制成单细胞悬液, 调整细胞计数约为 2×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板中, 孔板使用之前 PBS 润洗 2 遍并放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中饱和 30 min。每孔加入 100 μL 细胞悬液, 接种时要不停混匀以防细胞沉淀。每组设置 6 个复孔, 边缘孔使用 PBS 填充, 尽量减少培养基的蒸发, 将铺好的 96 孔板置于培养箱中。待细胞贴壁后, 进行同步化处理。同步化结束后, 加入相应浓度的药物继续孵育 24 h。药物干预结束后, 每孔加入 10 μL MTT 培养 4 h。4 h 后结晶即可形成, 小心吸走上清液, 加入 150 μL DMSO 置摇床低速震荡 10 min, 使结晶溶解。采用多功能酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 BBB 体外实验模型制备

采用单层内皮细胞体外模拟正常状态 BBB。在 Transwell 小室内接种适宜密度的细胞, 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养至细胞融合状态。从接种后的第 2 天起, 使用细胞电位仪每天测定细胞的跨膜电位(TEER), 连续测定 10 d, 当连续几天测得的电阻值接近恒定, 并且处于 80~140 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 时表明细胞紧密且完整, 认为 BBB 基本形成。TEER = $(\Omega_{\text{实验}} - \Omega_{\text{空白}}) \times S$, Ω 为跨膜电阻测量值, S 为插板底膜面积(12 孔插板底膜面积为 1.1 cm^2)。

2.4 药物透过 BBB 体外模型的通透性检测

实验分为对照组、溶媒组、冰片组、葛根素组、冰片+葛根素组。对照组分别向供给池和接收池中加入无血清培养基 0.5 mL 和 1.5 mL。溶媒组在供给池内加入含 0.1% DMSO 的无血清培养基 0.5 mL, 在接收池内加入无血清培养基 1.5 mL。给药组分别向供给池中加入含终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的冰片、葛根素、冰片+葛根素的无血清培养基 0.5 mL, 接收池中加入无血清的培养基 1.5 mL。于加药前和加药 24 h 后分别测量各组的 TEER。并且在加药 24 h 后取供给池内、外侧的培养基, 采用高效液相色谱法^[5]测量培养基里所含葛根素的浓度。用接收池葛根素的量除以加药的总量计算出药物透过率($P_{\text{药物}}$)。

$$P_{\text{药物}} = M_{\text{接收池}} / M_{\text{供给池}}$$

2.5 统计学处理

多样本均数比较采用方差分析, 两样本均数比较采用 t 检验, 应用 SPSS 22.0 统计软件进行处理,

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 细胞形态学观察

用 0.25% 胰酶消化细胞, 接种于 25 cm² 培养瓶中, 大部分细胞贴壁生长, 隔天换液, 细胞状态良好时大约 2~3 d 融合成片, 传代 1 次, 倒置显微镜下观察, 生长时 bEnd.3 细胞呈多边形或者三角形, 生长至 80%~90% 左右时呈梭形或长条形, 单层致密排列, 无重叠生长现象, 汇合成片后显现典型的铺路石样结构, 见图 1。

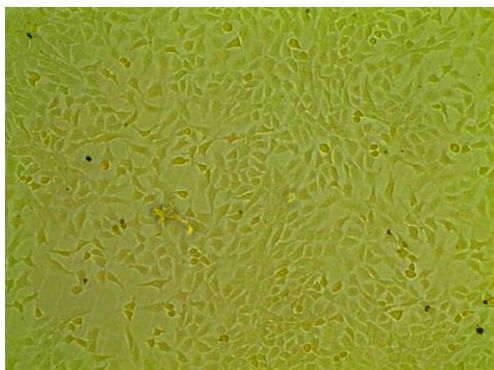


图 1 bEnd.3 细胞形态 (×40)

Fig. 1 Morphology of bEnd.3 cells (×40)

3.2 冰片和葛根素对 bEnd.3 细胞存活率的影响

如图 2 所示, 药物处理 bEnd.3 细胞 24 h 后, 溶媒并未影响细胞的存活。与对照组相比, 冰片浓度在 0.000 5~50 μmol/L 时, 细胞存活率大于 80%; 浓度为 500 μmol/L 时, 细胞存活率降低至 60%。因此, 选用冰片的浓度为 50 μmol/L 进行下一步实验研究。

如图 3 所示, 药物处理 bEnd.3 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 葛根素浓度在 0.000 5~500 μmol/L 时, 细胞存活率大于 85%。因此, 选细胞存活率最高的葛根素浓度 (50 μmol/L) 进行下一步实验研究。

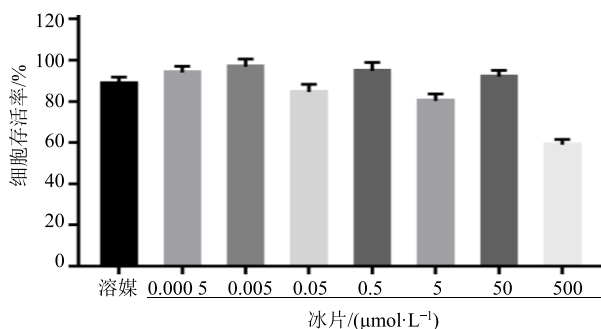


图 2 冰片对 bEND.3 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of borneol on viability of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

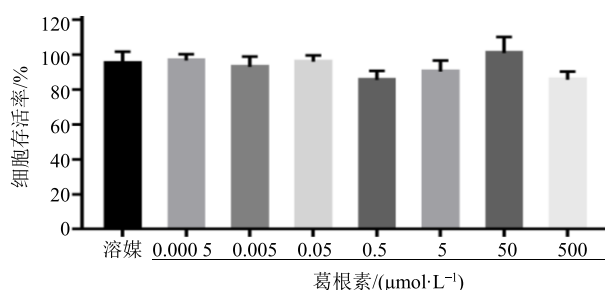


图 3 葛根素对 bEND.3 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of puerarin on viability of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 冰片对葛根素透过 BBB 体外模型通透性的影响

由表 1 结果可见, 各组给药前与给药 24 h 后 TEER 未见明显改变。采用本实验室前期建立的方法^[5], 检测培养基中葛根素浓度。计算得到葛根素组和冰片+葛根素组的葛根素透过率分别为 (59.96±5.90)% 和 (106.80±2.73)%, 两组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 1 各组给药前与给药 24 h 后 TEER 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Changes in TEER before administration and after 24 h of administration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TEER/(Ω·cm ²)	
	给药前	给药后
对照	136.3±10.6	129.3±11.6
溶媒	142.3±10.4	131.3±10.0
冰片	141.6±7.6	133.3±3.8
葛根素	134.6±13.3	124.3±7.1
冰片+葛根素	134.0±9.6	137.0±11.5

4 讨论

BBB 是维持脑内环境稳定的重要结构基础, 是一个复杂的细胞系统, 主要由内皮细胞、星形细胞、周皮细胞和血管周围的小胶质细胞以及基膜构成。脑微血管内皮细胞是 BBB 的主要结构基础, 在诱导、维持 BBB 完整性上具有重要意义。该内皮细胞非常扁平, 细胞之间紧密连接, 缺乏吞饮小泡和内皮细胞膜表面的负电荷也是 BBB 的独特特征。因此, 体外 BBB 模型的核心是培养脑微血管内皮细胞, 可以通过建立内皮细胞单层培养模型体外模拟 BBB 来研究药物的通透性^[6-8]。

本实验采用内皮细胞单层培养模型进行体外模拟 BBB, 该模型经过形态学、电阻和通透性方面的鉴定, 具备了 BBB 的基本特性, 适用于中枢神经系统药物跨 BBB 能力的研究^[9-11]。结果表明, 冰

片、葛根素单独应用或联合应用在 24 h 内对 BBB 紧密连接开放没有直接作用。但葛根素单独应用与冰片/葛根素联合应用相比,葛根素的 BBB 透过率有显著性差异,表明冰片开放 BBB,促进其他药物透过 BBB,可能是通过其他途径或者影响 BBB 特殊转运体的功能实现的。冰片能够抑制 P 糖蛋白(P-gp)的活性^[12],葛根素是 P-gp 的底物^[13],此机制是否与葛根素穿透 BBB 有关,还需进一步研究。此结果与前期在体动物实验^[14-15]所得结果相一致,可考虑从细胞的相关紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin、Claudin-5、Claudin-3 的表达水平来解释这一差异^[16-18],同时可探讨其腺苷受体通路对相关紧密连接蛋白的影响^[19-21],进一步揭示芳香开窍类中药冰片“开窍于脑”的相关机制。

此外课题组关于羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA) 研究结果显示,冰片可以显著增加 HSYA 的 BBB 透过率,但相比其对葛根素的作用较弱。葛根素是一种水难溶性黄酮类化合物,而 HSYA 是红花药理功效的有效水溶性部位,冰片对 2 种不同药物的促透作用显示出较大差异,因此还需进一步研究阐明冰片对脂溶性药物和水溶性药物促透作用是否有差异。随着研究的深入与技术的发展,冰片在辅助其他药物开放 BBB 及药物新剂型研发等方面将发挥作用。

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] 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.
- [3] 董先智, 汤小爱, 高秋华, 等. 冰片对顺铂透血脑屏障促进作用的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(4): 275-277.
- [4] 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.
- [5] 杨少林, 张晓翠, 向大雄. 脑得生口服微乳制剂与片剂在大鼠体内药动学比较 [J]. 中国医院药学杂志, 2016(9): 727-731.
- [6] Biegel D, Spencer D D, Pachter J S. Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties *in vitro* [J]. *Brain Res*, 1995, 692(18): 183-189.
- [7] Eddy E P, Maleef B E, Hart T K, *et al.* *In vitro* models to predict blood-brain barrier permeability [J]. *Advanced*

Drug Del Rev, 1997, 23(1/3): 185-198.

- [8] Helmut F, Hans-Joachim G, Carsten T. Beuckman primary cultures of brain microvessel endothelial cells: A valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier *in vitro* [J]. *Brain Res*, 2000, 5(3): 248-256.
- [9] 谢英, 叶丽亚, 张小滨, 等. 血脑屏障体外实验模型的建立 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36(4): 435-438.
- [10] Watanabe T, Dohgu S, Takata F, *et al.* Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5, and mouse brain endothelial cell 4 [J]. *Bio Pharm Bull*, 2013, 36(3): 492-495.
- [11] 何芳, 尹飞, 彭镜, 等. 永生化小鼠 Bend.3 细胞株具有脑微血管内皮细胞的屏障特性 [J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(6): 474-478.
- [12] Wu C, Liao Q F, Yao M C, *et al.* Effect of natural borneol on the pharmacokinetics and distribution of nimodipine in mice [J]. *Eur J Drug Metab Ph*, 2014, 39(1): 17-24.
- [13] Luo C F, Yuan M, Chen M S, *et al.* Pharmacokinetics tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solidlipid nanoparticles following oral administration [J]. *Int J Pharm*, 2011, 410(1/2): 138-144.
- [14] 吴雪. 芳香开窍药冰片及石菖蒲对脑得生主要活性成分透过血脑屏障影响的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [15] 吴雪, 欧阳丽娜, 向大位, 等. 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 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 734-737.
- [16] Papadopoulos D, Scheiner-Bobis G. Dehydroepiandrosterone sulfate augments blood-brain barrier and tight junction protein expression in brain endothelial cells [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2017, 1864(8): 1382-1392.
- [17] 彭镜, 尹飞, 李玉飞, 等. 川芎嗪对内毒素脂多糖诱导的体外血脑屏障模型通透性增高的保护作用及其机制 [J]. 解剖学杂志, 2007, 30(5): 594-596.
- [18] 彭镜, 尹飞, 甘娜, 等. 内毒素脂多糖对体外血脑屏障模型通透性的影响及其机制研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86(27): 1924-1926.
- [19] 赵博贤, 毕云科, 李宪峰, 等. 腺苷受体与血脑屏障通透性研究进展 [J]. 临床神经外科杂志, 2013, 10(4): 248-250.
- [20] Carman A J, Mills J H, Krenz A, *et al.* Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(37): 13272-13280.
- [21] Mills J H, Alabanza L, Weksler B B, *et al.* Human brain endothelial cells are responsive to adenosine receptor activation [J]. *Purinerg Signal*, 2011, 7(2): 265-273.