

三伏贴中芥子碱及细辛挥发油促进 HaCaT 细胞摄取延胡索乙素的作用及其机制研究

覃梦瑶¹, 阮文懿^{1#}, 翟苑好¹, 曹思思¹, 于恺悦¹, 王茵萍², 吴传斌¹, 徐月红^{1*}

1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

2. 南京医科大学第一附属医院 针灸科, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 研究三伏贴中芥子碱硫氰酸盐(SPT)及细辛挥发油(AEO)促进角质形成细胞 HaCaT 摄取延胡索乙素(THP)的作用及其机制。**方法** 采用 MTT 法检测 SPT、AEO 和 THP 对 HaCaT 细胞活力的影响;根据方中 THP 自发荧光的特点,采用激光共聚焦扫描显微镜可视化观察 SPT 及 AEO 促进 HaCaT 细胞摄取 THP 的作用,并用 HPLC 法测定 HaCaT 细胞中 THP 的量;以 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)为荧光探针,利用荧光偏振技术研究 SPT、AEO 及 THP 对 HaCaT 细胞的细胞膜流动性的影响。**结果** SPT 及 AEO 均能显著促进 THP 被 HaCaT 细胞摄取,且 AEO 的促进作用优于 SPT。SPT、THP、AEO 分别作用于 DPH 标记的 HaCaT 细胞后,AEO 组 HaCaT 细胞的荧光偏振度和细胞膜微黏度均显著降低,细胞流动性增加,证明 AEO 是通过提高细胞膜流动性从而促进 HaCaT 细胞摄取 THP,而 THP、SPT 均不能增加细胞膜流动性。**结论** 三伏贴中 SPT 及 AEO 均可促进 HaCaT 细胞摄取 THP,AEO 促进机制与其提高细胞膜流动性相关,而 SPT 的促进作用不是通过增加细胞膜流动性实现,其具体机制有待进一步探明。

关键词: 三伏贴;芥子碱;细辛挥发油;延胡索乙素;细胞摄取;细胞膜流动性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)02-0400-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.021

Study on mechanism of enhanced HaCaT cellular uptake of tetrahydropalmatine by asarum essential oil and sinapine in Sanfu Patch

QIN Meng-yao¹, RUAN Wen-yi¹, ZHAI Yuan-hao¹, CAO Si-si¹, YU Kai-yue¹, WANG Yin-ping², WU Chuan-bin¹, XU Yue-hong¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

2. Department of Acupuncture, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To study the mechanism of enhanced HaCaT cellular uptake of tetrahydropalmatine (THP) by asarum essential oil (AEO) and sinapine thiocyanate (SPT) in Sanfu Patch. **Methods** Effect of SPT, AEO, and THP on cell viability of HaCaT were determined by MTT. HaCaT cellular uptake of THP and the enhancing effects of AEO and SPT on THP uptake were visualized with confocal laser scanning microscope (CLSM) based on the green autofluorescence of THP, and the THP uptake content by HaCaT was further determined with HPLC. Moreover, HaCaT cells were labeled with diphenylhexatriene (DPH). After the labeled cells were treated with AEO, SPT, and THP, respectively, the cellular membrane fluidity was determined with fluorescence polarization technology. **Results** THP fluorescence intensity within HaCaT cells was significantly increased when THP was co-delivered with AEO or SPT respectively, and the THP content with each group within the cells was also significantly higher than that of THP delivered alone. In addition, AEO was superior to SPT in enhancing THP uptake by HaCaT cells. The fluorescence polarization and membrane micro-viscosity of HaCaT cells were significantly decreased after AEO treatment, which indicated that membrane fluidity was increased by the treatment with AEO. However, SPT or THP did not present the character of increasing the membrane fluidity. **Conclusion** HaCaT cellular uptake of THP can be enhanced by AEO and SPT of Sanfu Patch, in which AEO enhances the cellular

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073066, 81473358)

作者简介: 覃梦瑶(1989—),女,硕士,研究方向为药物新剂型。E-mail: qinmy3@mail2.sysu.edu.cn

*通信作者 徐月红 Tel/Fax: (020)39943119 E-mail: lssxyh@mail.sysu.edu.cn

#并列第一作者 阮文懿(1993—),女,硕士,研究方向为药物新剂型。E-mail: ruanwy5@mail2.sysu.edu.cn

uptake of THP through increasing the cellular membrane fluidity, while the mechanism of SPT in enhancing THP cellular uptake remains further clarification.

Key words: Sanfu Patch; sinapine thiocyanate; asarum essential oil; tetrahydropalmatine; cellular uptake; cellular membrane fluidity

三伏贴临床上用于预防和治疗肺系疾病,具有确切疗效,为国家中医药管理局推广的冬病夏治及治未病的代表性中医药适宜技术^[1]。每年三伏期间全国各地中医院、中西医结合医院及西医院广泛开展三伏贴贴敷治疗,已发展为中医临床的优势技术。与其大量的临床研究相比,三伏贴的基础研究却很匮乏。三伏贴方药源于《张氏医通》,该方主要由白芥子、延胡索、甘遂、细辛以 2:2:1:1 配比组成,具有利气祛痰、散寒逐饮之效。本课题组前期动物实验研究表明三伏贴复方效果优于方中各药味的单方^[2],虽然白芥子和延胡索为方中君药,但方中各药味在贴敷治疗中可能通过相互作用共同发挥预防和治疗疾病的作用。

三伏贴穴位贴敷治疗主要通过药物的有效成分对穴位的持续刺激及经皮渗透共同发挥作用,方中药物经皮渗透的效果成为影响其疗效的重要因素。本课题组前期的研究证实方中君药白芥子和延胡索的主要有效成分芥子碱硫氰酸盐(sinapine thiocyanate, SPT)及延胡索乙素(tetrahydropalmatine, THP)均能经皮渗透,且方中的细辛挥发油(asarum essential oil, AEO)可通过改变皮肤角质层中的脂质和蛋白流动性而促进 THP 的经皮渗透^[3-5]。同时,其他研究也报道了白芥子对 THP、蛇床子素、黄芩苷及 AEO 对镇痛定等药物的经皮促渗作用^[6-9]。上述研究均着眼于白芥子及细辛对表皮角质层的影响,而表皮屏障功能由角质层和活性表皮共同组成,方中的药味是否还能够通过影响活性表皮而发挥促渗作用尚不明确。为探明方中药物对活性表皮的影响,本研究以活性表皮中的角质形成细胞 HaCaT 为模型,以 THP 为探针,探究 SPT、AEO 是否具有促进 HaCaT 细胞摄取 THP 的作用,以及其发挥作用的机制,为进一步阐明三伏贴穴位经皮给药的作用机制提供实验依据。

1 仪器与材料

LSM710 型激光共聚焦扫描显微镜(CLSM),德国 Zeiss 公司;Agilent1260 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;QM4CW 荧光稳态光谱仪,上海千欣仪器有限公司;二氧化碳培养箱,美国 Thermo 公司;超净工作台,江苏安泰净化设备厂。

人永生表皮细胞 HaCaT 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

细辛(广州采芝林药业有限公司),经中山大学药学院生药学实验室赵志敏博士鉴定为马兜铃科植物华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的根茎。对照品 SPT(批号 111702-201504,质量分数 99.5%)、THP(批号 111702-201617,质量分数 99.8%)购于中国食品药品检定研究院。1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)、台盼蓝及噻唑蓝购于 Sigma-aldrich 公司;DMEM 培养基、胎牛血清、0.25%胰酶及青霉素-链霉素(双抗)购于美国 Gibco 公司;4%多聚甲醛,武汉谷歌生物科技有限公司。4',6'-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI),上海碧云天生物技术有限公司;不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液(PBS),吉诺生物医药技术有限公司。甲醇,色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;磷酸、三乙胺,分析纯,天津市致远化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 AEO 的提取^[5]

细辛药材粉碎,称取 250 g 药材粉末(过 80 目筛)置于圆底烧瓶中,加入 12 倍体积的水,浸泡 2 h,参照《中国药典》2015 年版水蒸气蒸馏法提取 5 h,得 AEO,提取率(挥发油提取量/药材量)为 2.15%。所提取的 AEO 置于 4 °C 冰箱中密封保存,备用。

2.2 供试品溶液的配制

2.2.1 SPT 溶液的配制 用超纯水溶解 SPT,配制质量浓度为 3.68 mg/mL 的储备液,4 °C 避光保存。用 DMEM 培养基将 SPT 储备液稀释成质量浓度依次为 1 860.00、920.00、110.40、92.00、36.80、9.20、3.68 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,备用。

2.2.2 THP 溶液的配制 THP 用二甲基亚砜(DMSO)溶解并配制质量浓度为 32 mg/mL 的储备液,4 °C 避光保存。用 DMEM 培养基将 THP 储备液稀释成质量浓度依次为 53.31、10.66、5.31、1.07 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,备用。

2.2.3 AEO 溶液的配制 用 DMSO 溶解“2.1”项下所提取的 AEO,配制质量浓度为 10 mg/mL 的储备液,4 °C 避光保存。用 DMEM 培养基稀释 AEO

储备液,得到质量浓度依次为 0.50、0.10、0.05、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,备用。

2.2.4 同时含 SPT 和 THP 溶液的配制 取“2.2.1”和“2.2.2”项下 SPT 储备液(3.68 mg/mL)和 THP 储备液(32 mg/mL),按一定比例混合,用 DMEM 培养基稀释混合溶液,配制成分含 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 和 110.4 $\mu\text{g/mL}$ SPT 的溶液。

2.2.5 同时含 THP 和 AEO 溶液的配制 取“2.2.2”和“2.2.3”项下 THP 储备液(32 mg/mL)和 AEO 储备液(10 mg/mL)按一定比例混合,用 DMEM 培养基稀释该混合溶液,配制成同时含 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 和 0.01 $\mu\text{g/mL}$ AEO 的溶液。

2.3 HaCaT 细胞培养

将复苏后的 HaCaT 细胞接种于 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基)中,并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

2.4 MTT 法检测 HaCaT 细胞活力

待 HaCaT 细胞生长至对数生长期,吸出上层培养基,用无菌,不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤 2 次,并用 0.25%胰酶消化后,加入完全培养基终止消化并制备细胞悬液,用血细胞计数板计数,调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养至细胞贴壁,吸出各孔上清液及未贴壁细胞,分别加入“2.2”项下不同质量浓度的 SPT、THP 及 AEO 溶液。每个质量浓度设 6 个复孔,并设对照组(培养液加细胞)和调零组(培养液不加细胞),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育。24 h 后,将药物吸出,加入 100 μL 无血清 DMEM 培养液,每孔避光加入 20 μL 的噻唑蓝溶液(5 mg/mL),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 4 h,弃去含有噻唑蓝的 DMEM 培养基,加入 150 μL 的 DMSO,在摇床低速振荡 10 min,显色。然后用酶标仪于 490 nm 波长测定各孔的吸光度(A)值。根据各孔的 A 值计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.5 CLSM 观察 HaCaT 细胞对 THP 的摄取

调整 HaCaT 细胞密度为 5×10^5 个/mL,接种于底部为玻璃材质的共聚焦皿,每皿加入细胞悬液 1 mL,轻轻振荡,使细胞均匀分散在培养基中,转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜,分别加入 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 溶液、同时含有 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 和 110.4 $\mu\text{g/mL}$ SPT 的溶液及同时含有 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 和

0.01 $\mu\text{g/mL}$ AEO 的溶液各 1 mL,培养 24 h。药物作用 24 h 后,去除上清液,用无菌,无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤 3 次。加入 0.04%台盼蓝室温孵育 15 min,淬灭细胞的荧光。用无菌,无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 4%多聚甲醛固定 10 min 后再加入 DAPI 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 染核,洗涤去除游离的 DAPI。将共聚焦皿置于 CLSM 下观察细胞对 THP 的摄取。THP 自发绿色荧光,可在 CLSM 中观察其在细胞内的分布。CLSM 条件为激发波长 488 nm;发射波长 520 nm;图片分辨率为 1024×1024 ;每点扫描次数:4 次;每次分辨率:16 bit;扫描区域放大倍数为 0.6;物镜放大倍数为 $40 \times$ 油镜。

2.6 HPLC 测定 HaCaT 细胞对 THP 的摄取量

以细胞摄取的 THP 为指标,定量研究 SPT 和 AEO 促进 THP 被 HaCaT 细胞吸收的程度。调整 HaCaT 细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,使用 6 孔板培养细胞,每孔加入 1 mL 细胞悬液,转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱,待细胞达到 60%~70%的融合度时分别加入 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 溶液、同时含有 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 和 110.4 $\mu\text{g/mL}$ SPT 的溶液及同时含有 5.31 $\mu\text{g/mL}$ THP 和 0.01 $\mu\text{g/mL}$ AEO 的溶液各 1 mL。药物作用 24 h 后,弃去上清液,用无菌,不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤 2 次,每孔加 500 μL 的 0.25%胰酶消化 4 min 后,加入 1 mL DMEM 完全培养基终止消化,用枪轻轻吹打,使细胞重悬,转移至 2 mL 已灭菌离心管中,用无菌,不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 洗涤、离心以除去未被摄取的药物,细胞计数,然后精密加入 500 μL 的甲醇,超声提取细胞内的 THP。利用 HPLC 法测定其量,色谱条件为 Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(三乙胺调 pH 至 6.0)(55:45);体积流量为 1 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为 326 nm;进样量为 20 μL 。

取 THP 对照品约 8 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得到质量浓度为 82.16 $\mu\text{g/mL}$ 的 THP 储备液。精密吸取上述储备液适量置于 10 mL 量瓶中,并用甲醇倍比稀释,分别得到质量浓度为 41.080、20.540、10.270、5.135、2.054、1.027 $\mu\text{g/mL}$ 的系列 THP 对照品溶液,分别取样 20 μL ,进样经 HPLC 测定峰面积(Y),以 Y 对质量浓度(X)进行线性回归,得到 THP 的标准曲线方程为 $Y = 18\,879 X + 334.17$ ($R^2 = 1.000$),说

明 THP 在 1.027~41.08 $\mu\text{g/mL}$ 峰面积与质量浓度的线性关系良好。

2.7 细胞膜流动性的测定

2.7.1 HaCaT 细胞荧光标记 收集对数期的 HaCaT 细胞, 以每孔 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度种于 6 孔板中, 每孔加完全培养基 1 mL, 37°C 、5% CO_2 的条件下培养 24 h 使之贴壁。实验设对照组 (完全 DMEM 培养液)、AEO 组 (0.01 $\mu\text{g/mL}$)、SPT (110.4 $\mu\text{g/mL}$)、THP 组 (5.31 $\mu\text{g/mL}$), 分别将培养液和药液加入各孔中, 培养 24 h。移除药液, 用 PBS 洗涤 2 次, 离心, 加 3 mL 2 $\mu\text{mol/L}$ DPH, 常温下温育 30 min 进行荧光标记, 再用 PBS 洗涤 2 次, 最后将标记好的细胞悬浮在 4 mL PBS 溶液中。

2.7.2 荧光偏振度和细胞膜微黏度 (η) 的测定^[10-11] 用荧光稳态系统 (PTI) 进行测定, 测定条件为氙灯光源, 荧光激发光波长为 362 nm, 发射光波长为 436 nm, 狭缝为 5 nm。分别测定与激发偏正光垂直和平行时的荧光强度 (I_{hh} 、 I_{HV})。根据公式 [荧光偏振度 = $(I_{\text{hh}} - I_{\text{HV}})/(I_{\text{hh}} + I_{\text{HV}})$ 、 $\eta = 2P/(0.46 - P)$, P 为荧光偏振度] 分别计算荧光偏振度值和 η 值。

3 结果

3.1 SPT、THP 及 AEO 对 HaCaT 细胞活力的影响

MTT 实验结果如图 1 所示。SPT 和 THP 质量浓度分别在 3.68~1 860 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.07~53.31 $\mu\text{g/mL}$ 时对 HaCaT 细胞无细胞毒性, 而 AEO 对 HaCaT 细胞的安全质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下。根据细胞毒

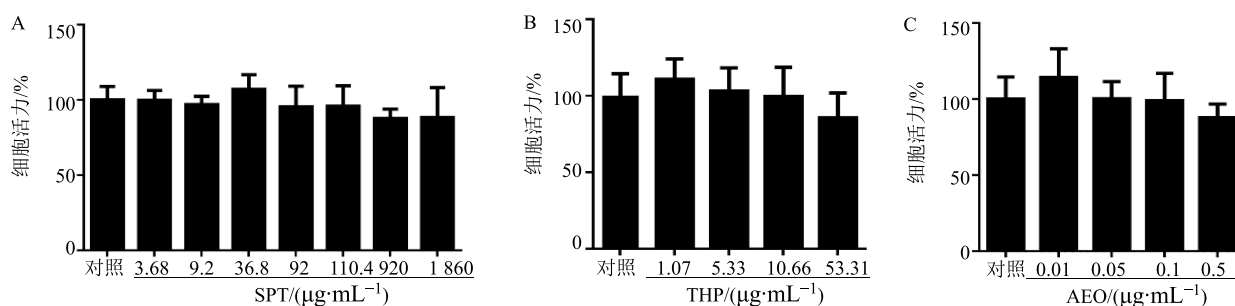


图 1 SPT (A)、THP (B) 和 AEO (C) 对 HaCaT 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effects of SPT (A), THP (B), and AEO (C) on cell viability of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

性实验结果, 结合三伏贴的配伍, 方中浸膏的 SPT、THP 及 AEO 的质量浓度分别为 110.4、5.31、0.01 $\mu\text{g/mL}$, 以此质量浓度进行细胞摄取实验对细胞不产生毒性。因此, 后续的细胞摄取实验中各成分均使用上述质量浓度。

3.2 SPT、AEO 对 HaCaT 细胞摄取 THP 的影响

CLSM 实验结果如图 2 所示。THP 作为小分子脂溶性药物, 具有一定的透膜能力, 自身能被 HaCaT 细胞摄取, 但 HaCaT 细胞呈现较弱的绿色荧光, 显示 THP 通过被动扩散进入 HaCaT 细胞的能力较弱。当加入 SPT 后 HaCaT 细胞绿色荧光增强, 表明 SPT 促进 THP 被 HaCaT 细胞摄取。同样, AEO 的加入显著增强了 HaCaT 细胞的绿色荧光, 表明 AEO 能促进 THP 被 HaCaT 细胞摄取, 且效果优于 SPT。

HPLC 法测得 THP、THP+SPT、THP+AEO 组细胞中 THP 的量分别为每 1×10^5 个细胞中含有 (15.69 $\pm$ 1.98)、(35.23 $\pm$ 3.42)、(63.63 $\pm$ 7.44) ng。与 THP 组比较, THP+SPT、THP+AEO 组细胞中

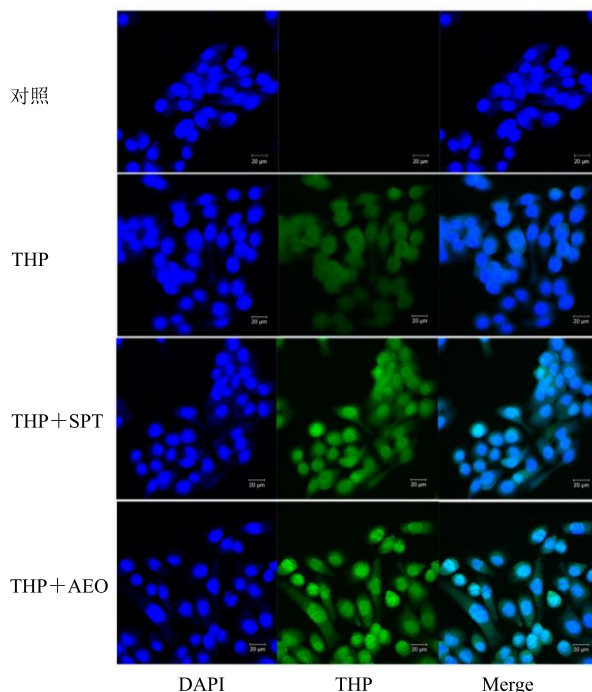


图 2 HaCaT 细胞摄取 THP 的激光共聚焦图

Fig. 2 Confocal microscopy of THP uptake by HaCaT cells

THP 的量显著增加 ($P < 0.05$)。因 THP 为亲脂性的小分子化合物, 能通过扩散作用进入细胞, 所以 THP 作用于 HaCaT 细胞 24 h 后, 细胞对 THP 有一定的摄取。而 SPT 和 AEO 显著促进 HaCaT 细胞摄取 THP, 且 AEO 促进能力优于 SPT。

3.3 SPT、AEO 和 THP 对 HaCaT 细胞膜流动性的影响

结果如图 3 所示。与对照组 (荧光偏振度为 0.141, $\eta = 0.904$) 相比, AEO 组 HaCaT 细胞的荧光偏振度 (0.111) 和 η (0.638) 值均显著降低 ($P < 0.05$), 说明 AEO 可以提高 HaCaT 细胞的细胞膜流动性, 从而有利于脂溶性的 THP 透膜入胞。而 SPT 作用于 HaCaT 细胞后, 其荧光偏振度 (0.197) 和 η (1.46) 值均显著提高 ($P < 0.05$), 细胞膜的流动性减弱, 说明 SPT 促进 THP 被 HaCaT 细胞摄取并不是通过增加细胞膜流动性而发挥作用的, 可能存在其他促进机制。同时, 与对照组相比, THP 组 HaCaT 细胞的荧光偏振度 (0.209) 显著升高 ($P < 0.05$), 而 η (0.964) 没有统计学差异, 说明 THP 自身也不是通过增加细胞膜流动性而被 HaCaT 细胞摄取的。

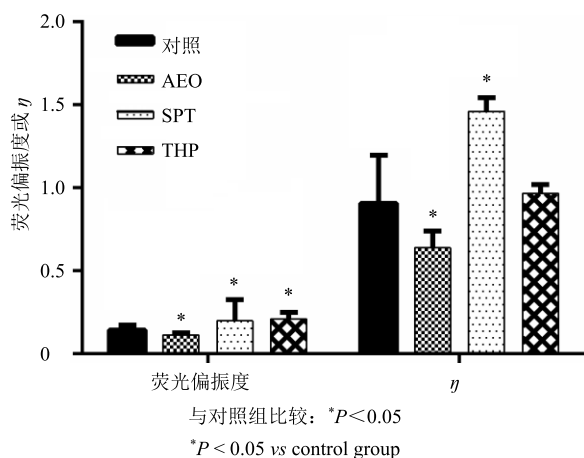


图 3 SPT、AEO 和 THP 对 HaCaT 细胞膜流动性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effects of SPT, AEO, and THP on membrane fluidity of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

三伏贴穴位敷贴广泛应用于临床预防和治疗肺系疾病, 具有确切疗效, 但方中各药味相互作用机制和作用方式尚待阐明。本研究以延胡索的主要药效成分 THP 为考察指标, 探究方中 SPT、AEO 对 HaCaT 细胞摄取 THP 的促进作用及其相关机制。

角质形成细胞为皮肤活性表皮中主要组成细

胞, HaCaT 细胞是一种重要的人表皮角质形成细胞, 常被用来构建组织工程皮肤用于皮肤屏障功能的评价^[12-13], 同时已成为研究外用透皮用药经皮渗透能力的一种重要细胞模型, 其对药物及载体的摄取与皮肤渗透性正相关^[14-15]。从 MTT 实验结果可知, 三伏贴浸膏所含 SPT、THP、AEO 在浸膏中的质量浓度条件下均对 HaCaT 细胞无细胞毒作用。利用 CLSM 可视化观察结果表明, THP 作用于 HaCaT 细胞后, 其自身能被 HaCaT 细胞部分摄取, 表明 THP 作为亲脂性小分子药物, 具有一定的经皮渗透及在活性表皮中滞留的能力。SPT 和 AEO 均能促进 THP 被 HaCaT 细胞摄取, 且 AEO 的促进效果优于 SPT。运用 HPLC 法测定细胞中 THP 的量, 进一步证实了二者对 HaCaT 细胞摄取 THP 的促进效果, 表明了三伏贴方中药味通过相互作用促进方中有效成分的经皮渗透和在活性表皮滞留, 从一定程度上验证了三伏贴复方用药的必要性及复方较单方的优越性, 同时也证明了三伏贴通过有效成分经皮渗透和皮肤滞留是其发挥作用的机制之一。

为阐明 SPT、AEO 促进 HaCaT 细胞摄取 THP 的机制, 本研究利用荧光偏振技术分别研究了 SPT、AEO、THP 作用于 HaCaT 细胞后其细胞膜流动性的变化。结果表明, 与对照组比较, AEO 作用于 HaCaT 细胞后其荧光偏振度和 η 均显著降低, 证实 AEO 可以通过提高细胞膜流动性促进 THP 透膜入胞, 同时增加皮肤活性表皮的流动性而降低皮肤屏障作用, 有利于方中有效成分的经皮渗透^[16-17]。而 SPT 作用于 HaCaT 细胞后, 其荧光偏振度和 η 均显著提高, 说明细胞膜的流动性减弱, SPT 并不是通过增加细胞膜流动性促进 HaCaT 细胞摄取 THP, 其作用机制有待进一步阐明。

综上所述, 本研究采用 HaCaT 细胞模型, 证实了三伏贴方中 SPT、AEO 均能促进 HaCaT 细胞摄取君药延胡索的主要有效成分 THP, 同时利用现代分析技术比较了 SPT、AEO 作用前后细胞膜流动性的变化, 证实了 AEO 通过提高 HaCaT 细胞的细胞膜流动性促进 THP 透膜入胞, 该机制为 AEO 促进方中有效成分经皮渗透和皮肤滞留的机制之一。本研究证明了三伏贴复方用药的必要性和优势, 为三伏贴穴位敷贴经皮渗透防治疾病提供实验支持, 同时也为该方的组方配伍提供新的研究思路和方法。

参考文献

- [1] 邓红卫, 朱慧志, 张 玉. 三伏贴在肺系疾病中的应用

- 现状及疗效影响因素分析 [J]. 国医论坛, 2015, 30(1): 65-67.
- [2] 王茵萍, 徐月红, 陈 宝, 等. “白芥子涂法”复方及单味药抗豚鼠哮喘效应的比较 [J]. 江苏医药, 2011, 37(14): 1643-1645.
- [3] 郭秀彩, 刘 霞, 徐月红. 白芥子涂方穴位与非穴位给药皮肤渗透特性的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 1034-1038.
- [4] 刘 霞, 郭秀彩, 林媛媛, 等. 穴位与非穴位皮肤生物物理学性质影响芥子碱渗透特性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1111-1116.
- [5] 阮文懿, 覃梦瑶, 万 涛, 等. 细辛挥发油促进芥子碱经皮渗透及其促透机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2197-2201.
- [6] 黄雨威, 黄水红, 黄怀吉, 等. “冬病夏治”方药配伍对延胡索乙素经皮吸收特性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 28-31.
- [7] 李 洋, 杨 丹, 赵永伟, 等. 白芥子对蛇床子体外经皮渗透的影响 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2014, 30(5): 532-535.
- [8] 刘 强, 陈兴兴, 孙学刚, 等. 白芥子促进黄芩苷透皮吸收的研究 [J]. 中医外治杂志, 2005, 14(4): 8-9.
- [9] 程 欣, 马云淑, 张晓雷, 等. 细辛挥发油对颠痛定体外促透皮作用的而研究 [J]. 中国中医药科技, 2008, 15(3): 193-194.
- [10] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 239-241.
- [11] Voss D, Montville T J. 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene as a reporter of inner spore membrane fluidity in *Bacillus subtilis* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. *J Microbiol Methods*, 2014, 96: 101-103.
- [12] 徐燕丰, 胡晋红, 朱全钢, 等. 酮洛芬及其异丙酯对 HaCaT 细胞构建的组织工程皮肤的渗透作用 [J]. 药学报, 2005, 40(9): 782-786.
- [13] 李 燕, 周宙霖, 卢 涛, 等. 利用 HaCaT 细胞构建新型组织工程皮肤检测模型 [J]. 武警医学, 2016, 27(7): 672-675.
- [14] Madheswaran T, Baskaran R, Yoo B K, *et al.* *In vitro* and *in vivo* skin distribution of 5 α -reductase inhibitors loaded into liquid crystalline nanoparticles [J]. *J Pharm Sci*, 2017, doi: 10.1016/j.xphs.2017.06.016.
- [15] Kaur A, Katiyar S S, Kushwah V, *et al.* Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(4): 1473-1482.
- [16] 兰 颐, 王景雁, 刘 艳, 等. 萜烯类经皮促透剂对皮肤活性表皮层的影响及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 643-648.
- [17] 傅大莉, 雍小兰, 刘德芳, 等. 冰片对 HaCaT 细胞膜流动性及膜电位的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(4): 62-66.