

乳香、没药挥发油促九分散方中生物碱类成分的 HaCaT 细胞摄取及其机制研究

高 玲, 黄诗雨, 陈丽华*, 李瑛瑛, 管咏梅, 刘丽丽, 朱卫丰

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 研究九分散中乳香、没药挥发油促进角质形成细胞 HaCaT 摄取马钱子碱、土的宁及盐酸麻黄碱的作用及其机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测乳香、没药挥发油单用/药对与九分散方中马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱配伍对 HaCaT 细胞存活率的影响; 采用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 定量分析法结合 BCA 蛋白试剂盒测定在乳香、没药挥发油作用下 HaCaT 细胞对 3 种生物碱 (马钱子碱、土的宁及盐酸麻黄碱) 细胞摄取的影响; 以 DiBAC4 (3) 为荧光探针, 利用流式细胞仪测定乳香、没药挥发油对 HaCaT 细胞膜电位的影响。**结果** 不同乳香、没药挥发油均对 3 种生物碱有一定促透作用, 且对脂溶性成分马钱子碱、土的宁的促透效果较水溶性成分盐酸麻黄碱好。乳香、没药挥发油分别作用于 DiBAC4 (3) 标记的 HaCaT 细胞后, 可降低 HaCaT 细胞膜电位, 随着乳香、没药挥发油浓度增加, 细胞膜电位荧光强度逐渐增强, 具有浓度相关性, 表现出类似氮酮的作用方式。**结论** 九分散中乳香、没药挥发油均可促进 HaCaT 细胞摄取 3 种生物碱, 促进机制可能通过影响皮肤表面负电荷而改变皮肤活性表皮屏障作用, 从而有利于药物透过皮肤活性表皮层, 其具体机制有待进一步探明。

关键词: 九分散; 乳香挥发油; 没药挥发油; 马钱子碱; 土的宁; 盐酸麻黄碱; 细胞膜电位

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)08-2357-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.019

A preliminary study on promoting effect of frankincense and myrrh volatile oil on HaCaT cell uptake of alkaloids in Jiufen Powder and its mechanism

GAO Ling, HUANG Shi-yu, CHEN Li-hua, LI Ying-ying, GUAN Yong-mei, LIU Li-li, ZHU Wei-feng

Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of the volatile oil of frankincense and myrrh in Jiufen Powder (九分散) in promoting keratinocyte HaCaT uptake of brucine, strychnine and ephedrine hydrochloride. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the effect of frankincense and myrrh volatile oil single use/drug pair on the survival rate of HaCaT cells when combined with brucine, strychnine, and ephedrine hydrochloride in Jiufen Powder prescriptions; LC-MS/MS quantified analytical method combined with BCA protein kit was used to determine the influence of the volatile oil of frankincense and myrrh on the uptake of HaCaT cells to three alkaloid cells; DiBAC4 (3) was used as a fluorescent probe to determine the effect of the volatile oil of frankincense and myrrh on HaCaT cell membrane potential. **Results** The volatile oils of different frankincense and myrrh all had a certain penetration promoting effect on the three alkaloids, and the penetration promoting effect on the lipid-soluble brucine and strychnine was better than the water-soluble ephedrine hydrochloride. After the volatile oil of frankincense and myrrh acted on the HaCaT cells labeled with DiBAC4(3), the volatile oil of frankincense and myrrh could reduce the membrane potential of HaCaT cells. As the concentration increased, the fluorescence intensity of the cell membrane potential increased and showed a significant concentration dependence, showing a similar mode of azone action. **Conclusion** Both frankincense and myrrh volatile oil can promote the uptake of three alkaloids by HaCaT cells. The promotion mechanism may change the active epidermal barrier function

收稿日期: 2020-12-19

基金项目: 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划 (20204BCJL22048); 江西省自然科学基金项目 (20181BAB205078); 江西省重大科技研发专项 (S2019ZDYFB0027); 江西中医药大学校级大学生创新创业训练计划 (202010412182)

作者简介: 高 玲 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药新制剂与新技术研究。E-mail: 857728223@qq.com

***通信作者:** 陈丽华 (1972—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂与新技术研究。E-mail: Chilly98@163.com

of the skin by affecting the negative charge on the skin surface, thereby facilitating the penetration of the drug through the active epidermal layer. The mechanism needs to be further explored.

Key words: Jiufen Powder; frankincense volatile oil; myrrh volatile oil; brucine; strychnine; ephedrine hydrochloride; cell membrane potential

九分散出自清代费山寿《急救应验良方》，历版《中国药典》均有收载，其处方由马钱子、麻黄、乳香、没药以 1:1:1:1 配比组成^[1]，具有活血散瘀、消肿止痛之功效，内服或外用治疗跌打损伤、瘀血肿痛。临床研究表明，九分散用于治疗痹症疗效显著^[2-4]，但由于处方中马钱子有毒性，用量较大，且久服易引起中毒，而外用则可降低毒性，且药物不经胃、肠、肝可直接到达病灶部位而发挥疗效，但九分散外用时以酒调敷于患处，其有效成分不易溶出且不易透过皮肤被吸收^[5]。为了将九分散处方制成合适的经皮给药制剂，需对其透皮吸收机制进行深入研究，以选择适合的剂型。

人永生角质形成细胞 HaCaT 是由成人表皮细胞自发转化而来的细胞系，具有永生性，并与角质形成细胞具有相似的增殖、分化特性，遗传特性稳定^[6]，常被用于构建组织工程皮肤进行皮肤屏障功能的评价，同时已成为研究外用透皮用药经皮渗透能力的一种重要的细胞模型。

现代研究表明乳香、没药中的挥发油类成分具有一定的促渗作用^[7]。课题组前期研究已发现乳香、没药挥发油对川芎中阿魏酸成分具有一定的透皮促渗作用^[8]，且体外 Franz 扩散池法及在体微透析透皮实验均表明乳香、没药挥发油对于马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的经皮渗透确实存在良好的促透作用，且在体给药时，其促透作用表现得更加明显。本实验以表皮角质形成细胞 HaCaT 为皮肤活性表皮模型，选择马钱子中马钱子碱、土的宁与麻黄中盐酸麻黄碱作为研究对象，从细胞和分子水平多层次系统探讨乳香、没药挥发油与 3 种生物碱配伍的透皮作用及其机制，为九分散经皮转运机制及新剂型的深入研究提供依据。

1 材料

1.1 细胞

人永生角质形成细胞系 HaCaT (上海富衡生物科技有限公司)。

1.2 药材

乳香、没药药材购于江西江中中药饮片有限公司 (批号分别为 181028、181217，于 2019 年 3 月 20 日购买)，由江西中医药大学中药鉴定教研室吴

志瑰副教授分别鉴定为橄榄科植物乳香树 *Boswellia bhaurdajiana* Birdw. 树皮渗出的树脂及橄榄科植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl. 的干燥树脂。

1.3 药品与试剂

无水硫酸钠 (分析纯，批号 20180322，西陇化工股份有限公司)；马钱子碱对照品 (质量分数 ≥ 98%，批号 17121401)、土的宁对照品 (质量分数 ≥ 98%，批号 19032003)，成都普菲德生物技术有限公司；盐酸麻黄碱对照品 (质量分数 100%，批号 7U9X-XPOG，中国食品药品检定研究院)；氮酮 (质量分数 97%，批号 RH137670，上海罗恩化学技术有限公司)；CCK-8 溶液 (批号 MAO218-L-Apr-25E，大连美仑生物科技有限公司)；胎牛血清 (批号 11G187，上海伊科赛生物制品有限公司)；0.25% EDTA-胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、无钙镁 HBSS、非必需氨基酸购于北京索莱宝科技有限公司；BCA 蛋白分析试剂盒 (批号 20200602，北京索莱宝科技有限公司)；TritonX-100 (批号 20190723H，范德北京生物科技有限公司)；DiBAC4 (3) 荧光探针 (批号 519A0101，金克隆北京生物技术有限公司)；乙腈 (色谱纯，批号 75-05-8，上海罗恩化学技术有限公司)；甲酸 (色谱纯，质量分数 98%，批号 LR40U51，北京百灵威科技有限公司)；细胞培养板 (6 孔板、96 孔板)、T-25 培养瓶。

1.4 仪器

SW-CJ-2F 超净工作台，苏州净化设备有限公司；Forma3111 二氧化碳培养箱，美国 Thermo 公司；TS100-F 倒置显微镜，日本 Nikon 公司；BD FACSVerser 高速分选型流式细胞仪，美国 BD 公司；MK3 酶标仪，美国 Thermo 公司；AB Sciex Triple Quad™ 4500 液相色谱-三重四级杆质谱联用仪，美国 AB Sciex 公司；HH-2 型数显恒温水浴锅，常州朗越仪器制造有限公司；十万分之一电子天平，德国 Sartorius 公司；KQ3200E 超声波清洗器，昆明市超声仪器有限公司；TDZ4A-WS 低速台式离心机，长沙湘仪离心机有限公司；3-18K 高速冷冻离心机，德国 SIGMA 公司。

2 方法

2.1 HaCaT 细胞培养

将 HaCaT 细胞接种于 T-25 细胞培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 双抗 (100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素) 的高糖型 DMEM 培养基培养, 并置于 37 $^{\circ}$ C、相对湿度 95%, 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞传代数在 50 代以内。

2.2 挥发油的提取

乳香、没药挥发油均采用《中国药典》2020 年版四部挥发油提取甲法^[9]提取, 得淡黄油状溶液, 无水硫酸钠脱水后密封避光保存。混合挥发油为等体积乳香、没药挥发油物理混合物; 药对挥发油为等质量乳香、没药生药材混合后采用上述方法提取, 得淡黄油状溶液, 无水硫酸钠脱水后密封避光保存, 备用。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液的配制 分别精密称取马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱对照品 1 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.1% DMSO 超声溶解, 再加入适量 DMEM 润洗转移至量瓶中, 并用 DMEM 定容, 混匀, 分别配制成 40、100、40 μ g/mL 的储备液, 使用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过除菌, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。用 DMEM 培养基将马钱子碱储备液稀释成质量浓度依次为 36、18、9、4.5、2.25、1.125 μ g/mL 的溶液, 将土的宁储备液稀释成质量浓度依次为 48、24、12、6、3、1.5 μ g/mL 的溶液, 将盐酸麻黄碱储备液稀释成质量浓度依次为 40、20、10、5、2.5、1.25 μ g/mL 的溶液, 备用。

2.3.2 乳香、没药挥发油溶液的配制 分别精密称取乳香、没药挥发油 10 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 1% DMSO 超声溶解, 再加入适量 DMEM 润洗转移至量瓶中, 并用 DMEM 定容, 混匀配制成 1 mg/mL 的储备液, 使用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过除菌, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。用 DMEM 培养基将乳香、没药挥发油储备液稀释成质量浓度依次为 0.80、0.40、0.20、0.10、0.05、0.02 mg/mL 的溶液, 备用。

2.3.3 乳香、没药药对/混合挥发油溶液的配制 精密称取乳香、没药药对/混合挥发油 10 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 1% DMSO 超声溶解, 再加入适量 DMEM 润洗转移至量瓶中, 并用 DMEM 定容, 混匀配制成 1 mg/mL 的储备液, 使用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过除菌, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。用 DMEM 培养基

将乳香、没药药对/混合挥发油储备液稀释成质量浓度依次为 0.32、0.16、0.10、0.08、0.04、0.02 mg/mL 的溶液, 备用。

2.3.4 氮酮溶液的配制 精密称取氮酮 1 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 1% DMSO 超声溶解, 再加入适量 DMEM 润洗转移至量瓶中, 并用 DMEM 定容, 混匀配制成 0.1 mg/mL 的储备液, 使用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过除菌, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。用 DMEM 培养基将氮酮储备液稀释成质量浓度依次为 96、48、24、12、6、3 μ g/mL 的溶液, 备用。

2.3.5 混合生物碱溶液的配制 根据马钱子碱、土的宁经皮中毒剂量及九分散中马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱这 3 种成分的比例^[1], 设置混合生物碱中马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的比例为 1:2:1。取“2.3.1”项下马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱储备液按照 1:2:1 比例, 以土的宁的安全浓度为参比, 用 DMEM 培养基将混合生物碱稀释成质量浓度依次为 12、6、3、1.5、0.75、0.375 μ g/mL 的溶液, 备用。

2.3.6 不同挥发油及氮酮与 3 种生物碱混合溶液的配制 乳香含挥发油 3%~8%, 没药含挥发油 2.5%~9%^[10], 按照九分散中马钱子、麻黄、乳香、没药的比例, 设置乳香/没药、马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的比例为 3:1:2:1。精密称取不同挥发油及氮酮 3 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.1% DMSO 超声溶解, 再加入适量 DMEM 润洗转移至量瓶中, 并用 DMEM 定容, 混匀配制成 120 μ g/mL 的储备液。按照 3:1:2:1 的比例与 3 种生物碱混合, 再用 DMEM 培养基依次稀释成“2.3.1”“2.3.5”项下含生物碱质量浓度溶液, 备用。

2.4 CCK-8 法测定 HaCaT 细胞存活率

待 T-25 培养瓶中 HaCaT 细胞生长至 80%~90% 时, 除去上层培养液, 用无钙镁 HBSS 清洗 2 次, 待 1 mL 0.25% 胰酶消化后加入 4 mL 完全培养液终止消化, 离心收集细胞并加入新鲜完全培养液制成 HaCaT 细胞悬浮液, 以 10×10^4 /mL 细胞密度 S 型接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 并设置不含细胞的完全培养液空白组和含细胞悬液对照组, 待细胞在培养箱中培养 24 h 后, 弃去培养基, HBSS 溶液清洗 2 次后, 给药组分别加入“2.3”项下不同质量浓度及种类的药物溶液 200 μ L, 空白组加入 200 μ L DMEM 培养基, 对照组加入含 0.1% (生物碱与挥发油混合配制) 或 1% (单独的挥发油及氮

酮) DMSO 的 DMEM 培养基。每个浓度设置 6 个复孔, 置于培养箱继续培养 4 h, 吸去培养液后, 每孔再加入 100 μ L 的 10% CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 取出, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A), 计算细胞存活率, 当存活率大于 90% 时, 可认为该药物浓度对细胞无毒性作用。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 LC-MS/MS 结合 BCA 蛋白试剂盒测定 HaCaT 细胞对 3 种生物碱的摄取量^[11]

LC-MS/MS 定量分析法色谱条件: 色谱柱为 ACE UltraCore Super C₁₈ 100A (100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.5 μ m), 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱程序: 0~1 min, 6% B; 1.0~2.5 min, 6%~15% B; 2.5~3.5 min, 15%~17% B; 3.5~3.6 min, 17%~95% B; 3.6~4.5 min, 95% B; 4.5~4.6 min, 95%~6% B; 4.6~6 min, 6% B。进样量为 2 μ L, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

分别精密称取 3 种生物碱 1 mg, 置于离心管中, 加入 0.1% DMSO 助溶, 用甲醇定容至 10 mL, 即得 100 μ g/mL 各对照品储备液。取各对照品储备液用 HBSS 进行稀释, 加入内标 (甲硝唑, 1 ng/mL) 得质量浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10 ng/mL 的马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱溶液; 进样量为 2 μ L。以马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱和甲硝唑峰面积之比 (Y) 为纵坐标, 以质量浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 加权后得其回归方程: 马钱子碱 $Y = 0.1502X - 0.108$ ($R^2 = 0.9996$), 土的宁 $Y = 0.3565X - 0.1379$ ($R^2 = 0.9999$), 盐酸麻黄碱 $Y = 4.798X + 0.2489$ ($R^2 = 0.9980$)。结果表明, 马钱子碱在 0.39~200 ng/mL、土的宁在 0.2~200 ng/mL、盐酸麻黄碱在 0.2~100 ng/mL 与峰面积之比呈良好的线性关系。

以细胞摄取的马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱为指标, 设置不同挥发油组、溶剂对照组 (不含挥发油的等浓度的生物碱溶液), 定量研究在不同挥发油作用单独给药 (含单一生物碱)、共同给药 (3 种生物碱混合) 时马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的细胞摄取量。调整 HaCaT 细胞密度为 4×10^5 /mL, 接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 置于细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞生长至 80%~90% 时, 用无钙镁的 HBSS 清洗 2 次, 分别加入 3 μ g/mL 马钱子碱及其与 9 μ g/mL 不同挥发

发油的混合溶液、6 μ g/mL 土的宁及其与 9 μ g/mL 不同挥发油的混合溶液、3 μ g/mL 盐酸麻黄碱及其与 9 μ g/mL 不同挥发油的混合溶液, 以及 3 种生物碱混合溶液与 9 μ g/mL 不同挥发油的混合溶液各 2 mL, 同时设置溶剂对照组, 给药 4 h 后, 吸去药液, 用无钙镁的 HBSS 清洗 2 次, 加入 1 mL HBSS, 冰上操作, 用细胞刮刀轻轻刮下细胞, 再加 0.5 mL HBSS 清洗至 1.5 mL 离心管中, 2500 r/min 离心 5 min, 除去上清液, 加入 200 μ L 含 0.1% TritonX-100 的 HBSS 溶液裂解细胞, 冰上裂解 20 min, 13 000 r/min 高速离心 10 min 后, 取上清液。一部分细胞裂解液用 BCA 蛋白试剂盒测定细胞蛋白含量; 另外一部分采用 LC-MS/MS 测生物碱含量, 精密吸取 100 μ L 细胞裂解液于 1.5 mL 离心管中, 加入 2 ng/mL 内标溶液 100 μ L, 置于混合器中涡旋 30 s 混匀, 16 000 r/min 离心 10 min, 吸取 100 μ L 上清液测定。计算单位蛋白中药物摄取量, 结果以 ng 药物/mg 蛋白表示。

2.6 细胞膜电位的测定^[12]

采用流式细胞仪测定乳香、没药挥发油及阳性促透剂氮酮对 HaCaT 细胞膜电位的影响。将密度为 4×10^5 /mL 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 设置空白对照组 (正常培养基)、对照组 (含 1% DMSO 培养基) 及低、中、高 (0.05、0.10、0.20 mg/mL) 质量浓度乳香挥发油组、没药挥发油组、药对挥发油组及混合挥发油组和氮酮 (0.0015、0.003、0.006 mg/mL) 组, 待细胞贴壁 24 h 后分别加入 2 mL 对应药物, 置 CO₂ 培养箱孵育 4 h 后, 用 HBSS 清洗 2 次, 用 0.5 mL 胰蛋白酶消化、离心, 用 HBSS 稀释并调整细胞密度 1×10^6 /mL, 离心去除上清液后加入 500 μ L DiBAC4 (3) (5 μ g/mL) 荧光探针溶液, 避光 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 0.5 h, 离心后弃上清液, 用 HBSS 清洗 2 次后再用 0.5 mL HBSS 分散, 吹匀过细胞滤网, 利用流式细胞仪进行细胞膜电位测定, 参数设置: 激发光波长 488 nm, 接收波长 530 nm, 用未经荧光物质孵育的 HaCaT 细胞调零。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 21 统计软件进行数据处理, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组组间采用单因素方差分析, 方差齐用 LSD 法, 方差不齐用 Games-Howell 法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 并采用 Graphpad Prism 8.0.2 作图。

3 结果

3.1 乳香、没药挥发油对 HaCaT 细胞存活率的影响

CCK-8 实验结果如图 1~3 所示。乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油、混合挥发油、氮酮、3 种生物碱均对 HaCaT 细胞存在明显细胞毒作用,且呈浓度相关性,对细胞无毒的质量浓度范围:乳香挥发油为 0~0.1 mg/mL,没药挥发油为 0~0.2 mg/mL,药对挥发油为 0~0.1 mg/mL,混合挥发油为 0~0.1 mg/mL,氮酮为 0~0.003 mg/mL,马钱子碱为 0~18 $\mu\text{g/mL}$,土的宁为 0~12 $\mu\text{g/mL}$,盐酸麻黄碱为 0~20 $\mu\text{g/mL}$ 。在挥发油的安全浓度下,3 种生物碱与不同挥发油无论是单独给药还是混合给药,乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油、混合

挥发油均使 3 种生物碱的无毒范围呈不同程度地下降。根据毒性实验结果,结合九分散的配伍,设置马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的质量浓度分别为 3、6、3 $\mu\text{g/mL}$,乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油、混合挥发油的质量浓度为 9 $\mu\text{g/mL}$ 对细胞不产生毒性,以此质量浓度进行细胞摄取实验。

3.2 不同挥发油对单独给药及共同给药时马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱在体外细胞摄取的影响

实验结果如图 4~6 所示,单独给药时,与溶剂组比较,乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油及混合挥发油组细胞中 3 种生物碱的量均明显增加 ($P < 0.01$),说明不同挥发油均对 3 种生物碱有一定促透作用,促透倍数均大于 2。

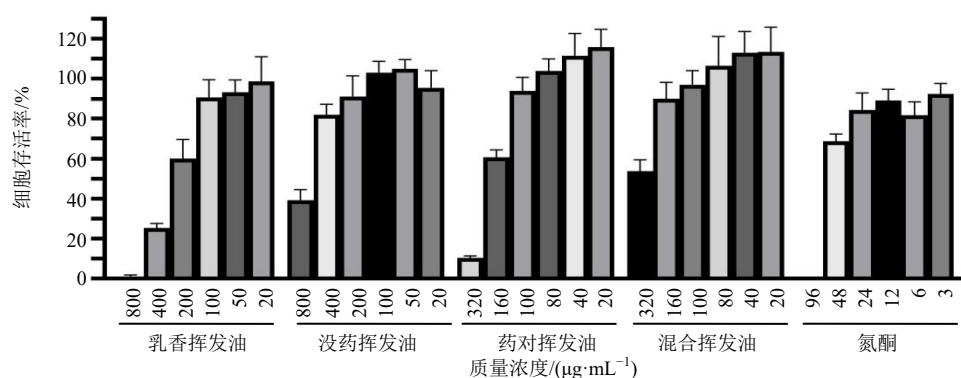


图 1 不同挥发油及氮酮对 HaCaT 细胞的毒性 ($n = 6$)

Fig. 1 Toxicity of different volatile oils and azone to HaCaT cells ($n = 6$)

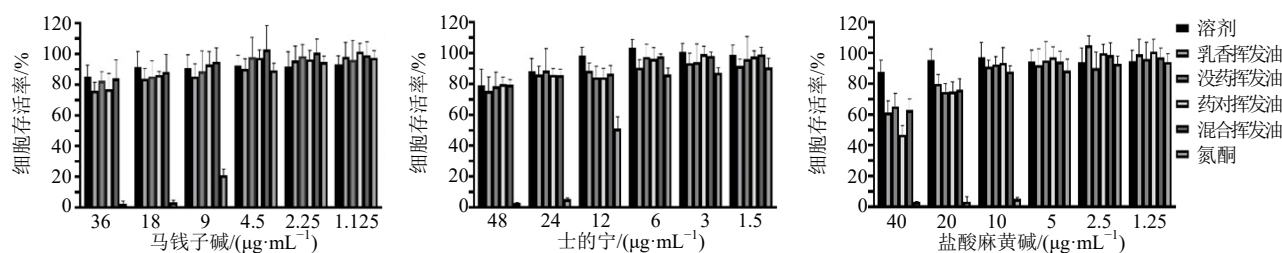


图 2 3 种生物碱单独与不同挥发油混合对 HaCaT 细胞的毒性 ($n = 6$)

Fig. 2 Toxicity of three alkaloids separately mixed with different volatile oils on HaCaT cells ($n = 6$)

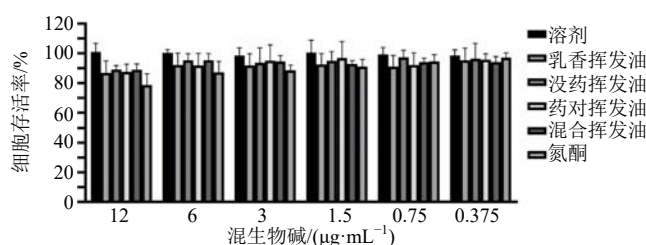
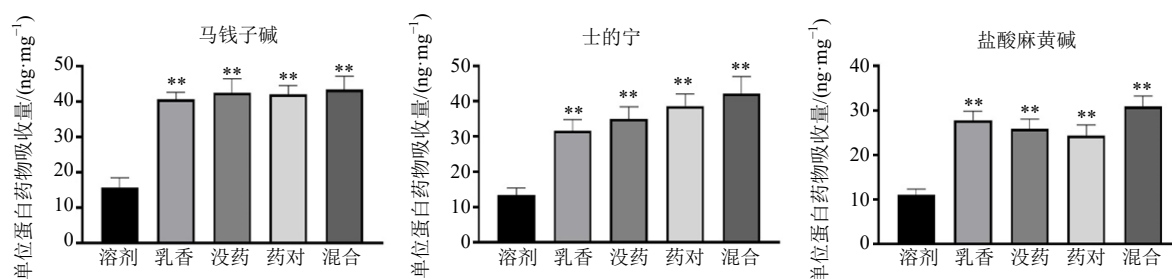


图 3 混合生物碱与不同挥发油混合对 HaCaT 细胞的毒性 ($n = 6$)

Fig. 3 Toxicity of three alkaloids together mixed with different volatile oils on HaCaT cells ($n = 6$)



与溶剂组比较: ** $P < 0.01$, 图 5 同

** $P < 0.01$ vs solvent group, same as fig. 5

图 4 3 种生物碱单独给药时不同挥发油对其细胞摄取量的影响 ($n = 6$)

Fig. 4 Effects of different volatile oils on cell intake of three alkaloids administered separately ($n = 6$)

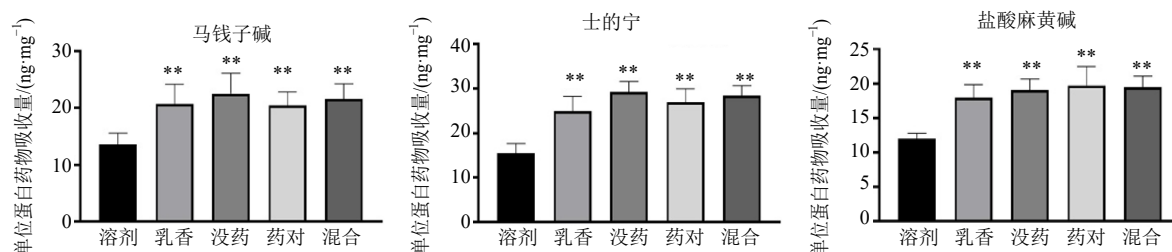
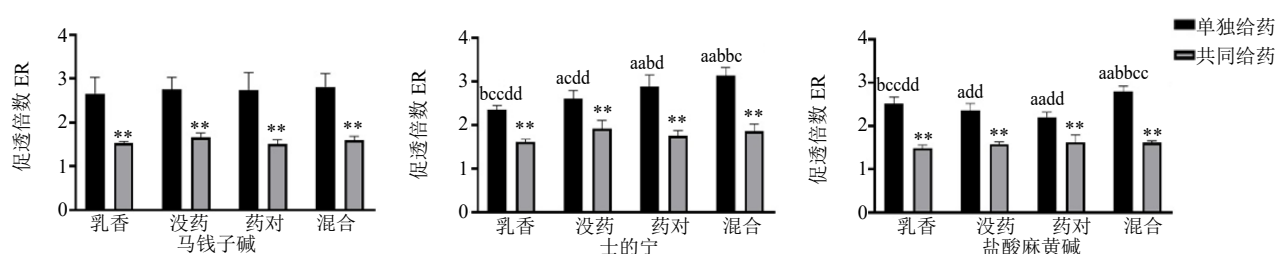


图 5 3 种生物碱共同给药时不同挥发油对其细胞摄取量的影响 ($n = 6$)

Fig. 5 Effects of different volatile oils on cell intake of three alkaloids administered together ($n = 6$)



与乳香组比较: ^a $P < 0.05$ ^{aa} $P < 0.01$; 与没药组比较: ^b $P < 0.05$ ^{bb} $P < 0.01$; 与药对组比较: ^c $P < 0.05$ ^{cc} $P < 0.01$; 与混合组比较: ^d $P < 0.05$ ^{dd} $P < 0.01$; 与单独给药方式比较: ** $P < 0.01$

^a $P < 0.05$ ^{aa} $P < 0.01$ vs frankincense group; ^b $P < 0.05$ ^{bb} $P < 0.01$ vs myrrh group; ^c $P < 0.05$ ^{cc} $P < 0.01$ vs drug pair group; ^d $P < 0.05$ ^{dd} $P < 0.01$ vs mixed group; ** $P < 0.01$ vs single dosing method

图 6 不同挥发油对 3 种生物碱的细胞内促透倍数 ($n = 6$)

Fig. 6 Intracellular penetration promotion multiple of different volatile oils on three alkaloids ($n = 6$)

共同给药时,与溶剂组比较,乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油及混合挥发油组细胞中 3 种生物碱的量均明显增加 ($P < 0.01$),促透倍数均大于 1。与单独给药比较,共同给药各挥发油促透倍数显著性下降 ($P < 0.01$),这与课题组前期体外扩散池、在体微透析的结果一致,说明 3 种生物碱共存时确实彼此间存在一定的影响。

3.3 不同挥发油对 HaCaT 细胞膜电位的影响

结果如图 7 所示,空白组与对照组之间荧光强度未表现出明显差异,说明 1% DMSO(对照组)

作为乳香挥发油、没药挥发油和氮酮的溶剂对 HaCaT 细胞膜电位没有显著影响。值得注意的是,角质细胞紧密连接外具有类似于上皮细胞的固定负电位,相关经皮促透剂可与这些负电荷发生相互作用,从而促进药物向皮肤深层部位转运^[13]。乳香低浓度组对 HaCaT 细胞膜电位没有显著性影响,但随着浓度增加,细胞膜电位荧光强度逐渐增强并表现出显著性差异 ($P < 0.01$),表明氮酮及乳香挥发油可以降低 HaCaT 细胞的膜电位。没药、药对、混合的低、中、高浓度组均能

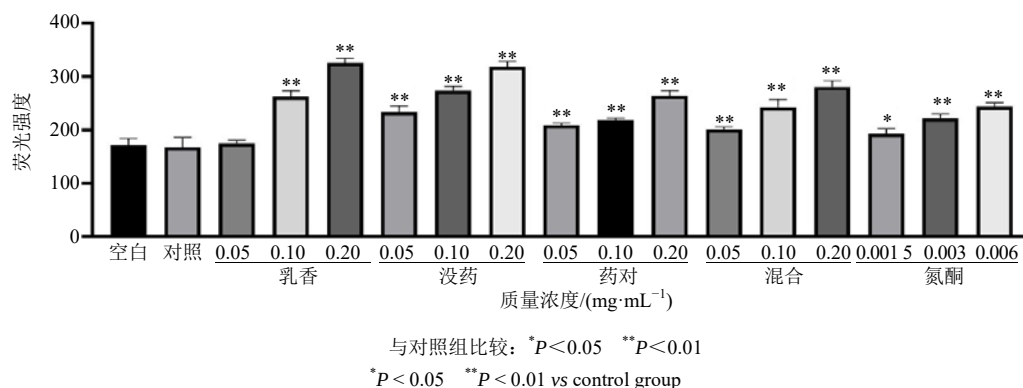


图 7 各组 HaCaT 细胞膜电位荧光强度 (n = 3)

Fig. 7 Fluorescence intensity of HaCaT cell membrane potential in each group (n = 3)

显著降低 HaCaT 细胞的膜电位 ($P < 0.01$)。

4 讨论

九分散是一种用于治疗痹症的中成药，目前广泛应用于类风湿关节炎、痛风等，具有确切疗效，但久服易中毒，外敷透皮性差。将九分散处方制成合适的透皮制剂，可以直接用于局部发挥药效，避免口服给药发生的肝首过效应和胃肠道的影响，减少用药次数以及灵活调节给药剂量，从而降低药物毒性作用^[14]，使其发挥出更好的疗效，但方中各药味相互作用机制和作用方式尚待探明。本研究选择马钱子中马钱子碱、土的宁生物碱与麻黄中盐酸麻黄碱生物碱作为研究对象，探讨乳香、没药挥发油对这 3 种生物碱的 HaCaT 细胞摄取促进作用及其相关机制，从而为九分散外用制剂的开发提供参考。同时对乳香没药挥发油的促透机制进行了探讨，为乳香、没药挥发油的使用提供依据。

挥发油类成分是乳香、没药的主要有效成分，乳香、没药含有烯类、醛类、酸类等挥发油，其主要挥发油成分乙酸辛酯具有显著的促透作用^[15]。挥发油属天然物质，其毒性低于化学促透剂，对亲水性和亲脂性药物均有较好的促透效果，CCK-8 毒性实验及体外细胞摄取实验也证实，乳香、没药挥发油单用及配伍的毒性均低于氮酮，对马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱均具有一定的促渗透作用，且对脂溶性的马钱子碱、土的宁促透效果好于水溶性的盐酸麻黄碱，考虑乳香、没药挥发油为两亲性天然促透剂。对比生物碱单独给药与按处方比例共同给药 2 种方式的挥发油促透倍数时，发现不同挥发油对马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的单独给药的促透倍数均在共同给药时出现显著性下降，推测这 3 种生物碱在共同经皮促透过程中或存在互相干扰。

皮肤角质细胞间连结处具有固定负电荷，文献研究显示^[12]，当一些经皮促透剂与这些负电荷发生相互作用时，可促进药物向皮肤深层部位转运而利于药物的透皮吸收。乳香、没药挥发油单用及药对混合均可降低 HaCaT 细胞的膜电位，表现出类似化学促透剂氮酮的作用方式，乳香、没药挥发油对 3 种生物碱的促透作用可能通过影响皮肤细胞表面负电荷而改变皮肤活性表皮屏障作用，从而有利于生物碱透过皮肤活性表皮层。研究表明乳香、没药混合组及药对组呈现出的作用并不是乳香、没药挥发油作用的加和，有文献报道乳香、没药配伍后的挥发油的化学成分及含量均有一定变化^[16]，具体涉及哪种化学成分的增减还有待进一步的实验研究。

综上所述，本研究采用 HaCaT 细胞模型，证实了九分散方中乳香、没药挥发油均能促进 HaCaT 细胞摄取九分散中马钱子活性成分马钱子碱、土的宁与麻黄活性成分盐酸麻黄碱，同时利用流式细胞仪比较了乳香、没药挥发油作用前后细胞膜电位的变化，表明乳香、没药挥发油通过提高 HaCaT 细胞的细胞膜流动性促进 3 种生物碱透膜入胞，该机制为乳香、没药挥发油促进方中有效成分经皮渗透和皮肤滞留的机制之一。九分散经皮转运机制的研究，可为更好地寻找作用强、毒性低的促透剂及设计促透剂复方提供理论依据，研究和开发出更多经皮给药产品，满足临床对多种疾病治疗的需要。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 52-498.
- [2] 王坤山. 推荐一个治痹良方“九分散” [J]. 河南中医, 1984, 4(5): 49-50.
- [3] 周世明. 九分散治疗痛痹 [J]. 四川中医, 1986, 4(2): 45.

- [4] 张月华, 伊春锦, 陆霞, 等. 古方九分散加味治疗痹病的观察与实验研究 [J]. 福建医药杂志, 1994, 16(5): 34.
- [5] 孙亦群. 九分散经皮给药制剂的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2001.
- [6] Boukamp P, Petrussevska R T, Breitkreutz D, *et al.* Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106(3): 761-771.
- [7] 朱小芳, 罗晶, 管咏梅, 等. 乳香没药挥发油对川芎体外透皮吸收的影响及其皮肤血流促透机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 680-685.
- [8] 管咏梅, 陶玲, 朱小芳, 等. 乳香没药挥发油对川芎中阿魏酸促透机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(17): 3350-3355.
- [9] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 233.
- [10] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 1167.
- [11] 张馨, 王莉芳, 陈佳琪, 等. 龙血竭酚类提取物主要成分在 Caco-2 细胞中吸收机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4889-4895.
- [12] 兰颐, 李辉, 陈岩岩, 等. 花椒油对 HaCaT 细胞膜流动性及膜电位的影响及其机制研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(1): 44-51.
- [13] 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.
- [14] 熊璐琪, 李国锋, 苏碧雅, 等. 醋酸地塞米松和地塞米松磷酸钠的油水分分配系数与其经皮渗透行为之间的相关性研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(6): 439-446.
- [15] 赵金凤. 乳香和没药挥发性成分的分析及其经皮吸收研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [16] 王艳艳, 王团结, 宿树兰, 等. 乳香、没药药对配伍挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(2): 31-34.

[责任编辑 潘明佳]