

冰片对积雪草苷透过大鼠血脑屏障的影响

侯天衡*, 李晓波, 彭崇胜[#](上海交通大学药学院, 上海 200240)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3939-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.15

摘要 目的:研究冰片对积雪草苷透过大鼠血脑屏障的影响。方法:144只SD大鼠随机均分为4组,每组36只。A组,ig积雪草苷30 mg/kg;B组,尾iv积雪草苷30 mg/kg;C组,ig冰片100 mg/kg+ig积雪草苷30 mg/kg;D组,ig冰片100 mg/kg+尾iv积雪草苷30 mg/kg。采用高效液相色谱法测定给药后15、30、60、90、180、300 min各组大鼠脑组织中积雪草苷浓度,用DAS 2.0软件计算药动学参数。结果:A组大鼠脑组织未检出积雪草苷,B、C、D组大鼠的 c_{max} 分别为 (0.61 ± 0.03) 、 (0.85 ± 0.08) 、 (0.99 ± 0.08) mg/L, $AUC_{0-300\text{ min}}$ 分别为 (55.39 ± 2.71) 、 (89.88 ± 7.30) 、 (92.24 ± 9.24) $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (58.52 ± 2.75) 、 (92.90 ± 7.08) 、 (93.16 ± 8.62) $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$,其中C、D组大鼠的 c_{max} 、 $AUC_{0-300\text{ min}}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著高于B组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:冰片可促进积雪草苷透过大鼠血脑屏障,增加其在脑组织中的药物浓度。
关键词 冰片;积雪草苷;血脑屏障;高效液相色谱法;药动学;大鼠

Effects of Borneol on the Penetration of Asiaticoside through the Blood Brain Barrier in Rats

HOU Tianheng, LI Xiaobo, PENG Chongsheng (School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of borneol on the penetration of asiaticoside through the blood brain barrier in rats. **METHODS:** 144 SD rats were randomly divided into 4 groups, 36 for each group. Group A was given asiaticoside 30 mg/kg intragastrically; group B given asiaticoside 30 mg/kg via tail vein; group C given borneol 100 mg/kg intragastrically and asiaticoside 30 mg/kg intragastrically; group D given borneol 100 mg/kg intragastrically and asiaticoside 30 mg/kg via tail vein. The concentrations of asiaticoside in brain tissue were determined by HPLC at 15, 30, 60, 90, 180, 300 min after medication, and pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 software. **RESULTS:** Asiaticoside was not found in group A. The pharmacokinetic parameters of group B, C and D were that c_{max} were (0.61 ± 0.03) , (0.85 ± 0.08) , (0.99 ± 0.08) mg/L; $AUC_{0-300\text{ min}}$ were (55.39 ± 2.71) , (89.88 ± 7.30) , (92.24 ± 9.24) $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$; $AUC_{0-\infty}$ were (58.52 ± 2.75) , (92.90 ± 7.08) , (93.16 ± 8.62) $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$, respectively. c_{max} , $AUC_{0-300\text{ min}}$ and $AUC_{0-\infty}$ of group C and D were obviously higher than those of group B ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Borneol can enhance the penetration of asiaticoside through blood brain barrier of rats, so as to increase the concentration of asiaticoside in the brain tissue.
KEYWORDS Borneol; Asiaticoside; Blood brain barrier; HPLC; Pharmacokinetics; Rats

积雪草苷(分子式: $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$)是从积雪草(*Centella Asiatica* L.)全草中提取得到的五环三萜皂苷类成分,为该植物的主要有效成分。动物实验表明,积雪草苷对脑缺血-再灌注损伤引起的炎症反应有保护作用^[1],对认知障碍^[2]、抑郁、焦虑^[3-4]、阿尔茨海默病^[5]等均有良好的疗效。但文献报道积雪草苷口服给药绝对生物利用度较低、生物膜透过性差、吸收差、肠道滞留时间长且可被肠道菌群代谢,原型药吸收入血的量很少^[6]。因此,积雪草苷很难透过肠黏膜吸收入血,更难以透过血脑屏障进入脑组织中发挥疗效,限制了其作为中枢神经类疾病药物的应用。冰片(分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$)是一种小分子脂溶性单萜类化合物,口服吸收迅速,能很快通过血脑屏障,通常口服5 min后即可在脑组织中检测到,且蓄积量高、滞留时间较长^[7]。研究发现,冰片可以生理性开放血脑屏障,促进其他物质透过血脑屏障进入脑组织,提高其他药物在脑组织中的药物浓度和生物利用度^[8],不会破坏药物分子自身结构。同时,冰片可以增加药物在脑组织中的蓄积量^[9]。因此,在本研究中笔者探讨

了冰片对积雪草苷透过血脑屏障的影响,为积雪草苷和冰片联合给药提供理论依据。积雪草苷和冰片的化学结构式见图1。

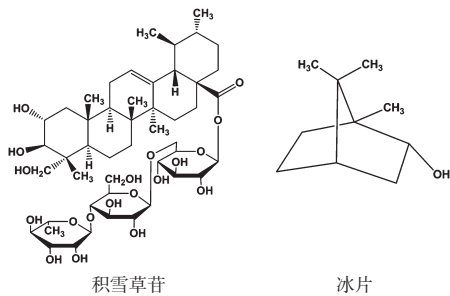


图1 化学结构式

Fig 1 The chemistry structure

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1311A四元泵、G1329A自动进样阀、Chemstation 6.01色谱工作站、G1316A柱温箱、G1315D二极管阵列检测器(美国安捷伦公司);LE225D电子分析天平(德国Sartorius公司);5417R低温高速离心机(德国Eppendorf公司);Milli-Q Advantage超纯水仪(美

* 硕士研究生。研究方向:天然产物。电话:021-34207064。E-mail:1281398841@qq.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:天然产物。E-mail: cspeng@sjtu.edu.cn

国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

积雪草苷原料药(上海医药工业研究院,批号:09.01.996-p-1507050,纯度:90%);积雪草苷对照品(批号:K1414085,纯度:>98%)和酸枣仁皂苷 A(批号:11221043,纯度:>98%)均购自上海阿拉丁试剂公司;冰片(上海雷允上药业有限公司,药用级);1,2-丙二醇、聚山梨酯 80、聚乙二醇 400 均为分析纯,乙腈、甲醇均为色谱纯。

1.3 动物

144 只 SPF 级 SD 大鼠,♂,体质量 180~220 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[合格证号:SCXK(沪)2008-0016]。所有大鼠适应性饲养 1 周后用于实验,给药后禁食不禁水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:水(A)-乙腈(B),梯度洗脱,(0~15 min,20%→46% B;15~16 min,46%→100% B;16~21 min,100% B;21~22 min,100%→20% B;22~27 min,20% B);流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:205 nm;进样量:10 μl。

2.2 对照品溶液制备

精密称取积雪草苷对照品 5.0 mg,置于 25 ml 量瓶中,甲醇溶解、定容,得质量浓度为 200 μg/ml 的对照品溶液。取对照品溶液适量依次稀释为质量浓度为 120、80、36、24、15、9、3、1.5 μg/ml 的系列对照品溶液,置于 4 ℃ 冰箱保存,备用。

2.3 内标溶液制备

精密称取酸枣仁皂苷 A 2.0 mg,置于 10 ml 量瓶中,甲醇溶解、定容,得质量浓度为 200 μg/ml 的内标溶液,并依次稀释至 15.3 μg/ml,置于 4 ℃ 冰箱保存,备用。

2.4 方法学考察

建立积雪草苷的 HPLC 检测法,并按照《中国药典》相关规定考察标准曲线、精密度、提取回收率和基质效应等。

2.5 分组与给药

144 只 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 36 只。A 组,ig 积雪草苷 30 mg/kg;B 组,尾 iv 积雪草苷 30 mg/kg;C 组,ig 冰片 100 mg/kg+ig 积雪草苷 30 mg/kg;D 组,ig 冰片 100 mg/kg+尾 iv 积雪草苷 30 mg/kg。给药剂量根据预实验得出。其中,冰片给药溶液:取适量冰片溶于丙二醇,加入 2 滴聚乙二醇 400,振荡混匀后加入 2 滴聚山梨酯 80,混匀后加入适量生理盐水配成所需浓度,即得。冰片-积雪草苷给药溶液:取适量冰片溶于丙二醇,加入 2 滴聚乙二醇 400,振荡混匀后加入 2 滴聚山梨酯 80,混匀后加入适量积雪草苷,完全溶解后加入适量生理盐水配成所需浓度。积雪草苷给药溶液:除不加冰片外,操作同冰片-积雪草苷给药溶液。

2.6 脑组织样品获取和处理

给药后 15、30、60、90、180、300 min 时各组大鼠取 6 只 ip 水合氯醛麻醉,用生理盐水心脏灌注后取脑组织^[10],锡箔纸包裹,放入液氮中冷冻 5 min 后,转移至 -80 ℃ 冰箱保存,待用。称取适量脑组织,加入 2 倍量 4 ℃ 生理盐水匀浆。取匀浆液 0.3 ml,加入 0.6 ml 甲醇(含 0.6 μg 内标),涡旋 2.0 min,于 4 ℃ 冰箱静置 1 h 后,离心(离心半径为 10 cm,14 000 r/min,下同)25 min,取上清液置于 1.5 ml EP 管中,于室温用轻柔氮气吹干,残渣用 100 μl 甲醇复溶,涡旋 2.0 min,离心 25 min。取上清液 10

μl 进样测定。记录积雪草苷和内标的峰面积,采用内标法定量。

2.7 参数计算与统计学方法

采用 DAS 2.0 药动学软件计算药动学参数。

采用 SPSS 22.0 和 Microsoft Excel(2010)对所得数据进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察结果^[11]

3.1.1 专属性 积雪草苷有较强的色谱峰和较好的分离度,脑组织中基质不干扰样品的测定;积雪草苷、酸枣仁皂苷 A 的保留时间分别为 10.2、14.3 min。本方法具有较高的专属性。色谱图见图 2。

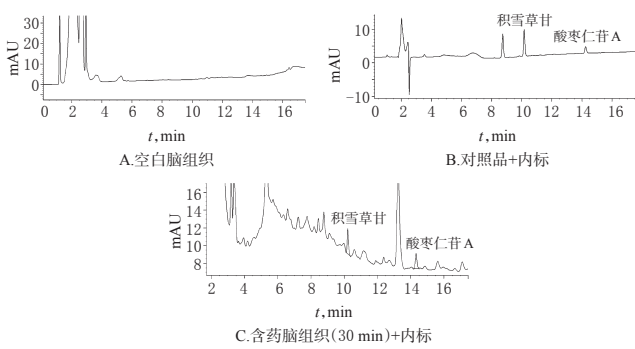


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

3.1.2 标准曲线及线性范围 取空白脑匀浆液加入积雪草苷对照品、内标溶液,制备质量浓度为 0.2、1.0、3.0、5.0、8.0、12.0 μg/ml 的积雪草苷质控样品(QC),按“2.1”“2.6”项下方法处理并测定。以积雪草苷的质量浓度(x , μg/ml)为横坐标、积雪草苷峰面积与内标峰面积比值(y)为纵坐标,得积雪草苷的回归方程为 $y = 0.430\,97x + 0.143\,73$ ($r = 0.995\,9$),线性范围为 0.2~12 μg/ml,定量下限为 0.2 μg/ml。

3.1.3 精密度、提取回收率与基质效应 积雪草苷的日内、日间 RSD 均小于 18% ($n = 5$);提取回收率均大于 80.0% ($RSD \leq 7.54\%$, $n = 5$);基质效应在 76.28%~91.94% 之间 ($RSD < 15\%$, $n = 3$)。

3.2 积雪草苷在大鼠脑内的药动学参数

采用 DAS 2.0 药动学软件对所得数据进行分析,药-时曲线见图 3,主要药动学参数见表 1(由于 A 组大鼠脑组织中未检出积雪草苷,无法计算药动学参数)。

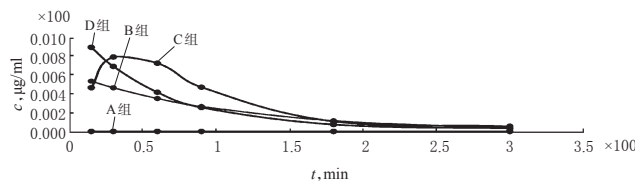


图3 各组大鼠脑组织中积雪草苷的平均药-时曲线($n = 6$)

Fig 3 Mean concentration-time curves of asiaticoside in brain tissue of rats in each group ($n = 6$)

由图 3 可知,C 组大鼠脑组织中可以检测到积雪草苷,其最高质量浓度约 0.8 μg/ml,而 A 组大鼠脑组织检测不到积雪草苷。由表 1 可知,B、C、D 组大鼠的 $c_{\max}$ 分别为 (0.61 ± 0.03) 、 (0.85 ± 0.08) 、 (0.99 ± 0.08) mg/L, $AUC_{0-300\text{ min}}$ 分别为 $(55.39 \pm$

表1 3组大鼠脑组织中积雪草苷的药动力学参数(n=6)

Tab 1 The pharmacokinetic parameters of asiaticoside in brain tissue of rats in 3 groups(n=6)

药动力学参数	B组	C组	D组
AUC _{0-300 min} , μg·min/ml	55.39 ± 2.71	89.88 ± 7.30**	92.24 ± 9.24**
AUC _{0-∞} , μg·min/ml	58.52 ± 2.75	92.90 ± 7.08**	93.16 ± 8.62**
MRT _{0-300 min} , min	71.18 ± 6.84	84.86 ± 2.63***	64.75 ± 1.34*
MRT _{0-∞} , min	88.44 ± 8.31	100.24 ± 7.53***	71.36 ± 2.21*
t _{max} , min		55.00 ± 12.48	
c _{max} , mg/L	0.61 ± 0.03	0.85 ± 0.08***	0.99 ± 0.08**
t _{1/2} , min	59.24 ± 9.55	54.33 ± 19.52	41.08 ± 11.34*
CLz/F, L/(min·kg)	0.51 ± 0.02	0.33 ± 0.03**	0.32 ± 0.02**

注:与B组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与D组比较,**P*<0.05,****P*<0.01
Note: vs group B, **P*<0.05, ***P*<0.01; vs group D, **P*<0.05, ****P*<0.01

2.71)、(89.88 ± 7.30)、(92.24 ± 9.24) μg·min/ml, AUC_{0-∞}分别为(58.52 ± 2.75)、(92.90 ± 7.08)、(93.16 ± 8.62) μg·min/ml。其中C、D组大鼠的c_{max}、AUC_{0-300 min}、AUC_{0-∞}、MRT_{0-300 min}、MRT_{0-∞}均显著高于B组(*P*<0.05或*P*<0.01);C组大鼠的MRT_{0-300 min}、MRT_{0-∞}显著高于D组,c_{max}低于D组(*P*<0.05或*P*<0.01),但C、D组大鼠的AUC_{0-300 min}、AUC_{0-∞}、t_{1/2}和CLz/F之间比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

4 讨论

积雪草苷具有抗抑郁的药理活性^[12],但受其分子质量大、溶解度小、吸收差等因素限制,难以通过血脑屏障进入脑组织,这可能是导致积雪草苷至今未开发为治疗中枢神经疾病类药物的原因之一。研究显示,ig冰片4 h后大鼠脑毛细血管内皮细胞之间的紧密连接缝隙变宽、断续、结构减少,8 h时达到高峰,48 h时恢复正常^[13],提示冰片可使血脑屏障的超微结构发生可逆性改变。另有文献报道冰片对P糖蛋白的活性有明显的抑制作用,表明冰片可以减弱转运蛋白的外排作用^[14]。

脑组织中药动力学研究一般采用微透析和全脑匀浆法,2种方法各有优劣。微透析法可以实时探测脑组织中的药物浓度,个体差异较小;但微透析手术时大鼠处在麻醉状态下,对实验结果的影响较大,其药动力学参数不能很好地反映大鼠正常生理状况下药动力学数据。加之微透析装置价格昂贵,且微透析探测的药物浓度是大鼠脑脊液中药物浓度,并不是脑组织中的药物浓度。而全脑匀浆法需要动物数量大,有个体差异,但此方法测定的是大鼠脑组织中真实的药物浓度。综合考虑后本实验选择全脑匀浆法。

积雪草苷在血浆中药动力学已有文献报道^[6],但未见文献报其在大鼠脑组织的药动力学情况。本研究首次报道了积雪草苷和冰片配伍以及积雪草苷大鼠脑组织中药动力学参数。实验结果显示,A组大鼠脑组织中未检测出,表明积雪草苷难以通过ig给药到达大鼠脑组织,与文献[6-8]的报道一致。但B、C、D组大鼠脑组织中均可检测到积雪草苷,表明冰片可以辅助积雪草苷透血脑屏障进入脑组织。各组大鼠药动力学参数表明,冰片可以增加积雪草苷在大鼠脑组织的蓄积量,降低其在大鼠脑组织中消除速率、增加停留时间。考虑到实际临床应用,冰片联合积雪草苷ig给药可能是最优的给药方式。

综上所述,冰片可促进积雪草苷透过血脑屏障,增加其在脑组织中的药物浓度。

参考文献

[1] Chen S, Yin ZJ, Jiang C, *et al.* Asiaticoside attenuates memory impairment induced by transient cerebral ischemia-reperfusion in mice through anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, doi: 10.1016/j.pbb.2014.03.004.

[2] Lin X, Huang R, Zhang S, *et al.* Beneficial effects of asiaticoside on cognitive deficits in senescence-accelerated mice[J]. *Fitoterapia*, 2013, doi: 10.1016/j.fitote.2013.03.023.

[3] Liang X, Huang YN, Chen SW, *et al.* Antidepressant-like effect of asiaticoside in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 89(3):444.

[4] Chen SW, Wang WJ, Li WJ, *et al.* Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 85(2):339.

[5] Xu CL, Wang QZ, Sun LM, *et al.* Asiaticoside: attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 100(3):413.

[6] 欧阳丹薇,肖峰,秦燕,等.大鼠血浆中积雪草总苷多成分的LC-MS法测定及其药理学[J].*中国医药工业杂志*, 2014, 45(5):460.

[7] 翁骏.积雪草苷及其类似物的吸收和代谢性质研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2006.

[8] 黄怀鹏,刘彩霞.积雪草苷大鼠在体肠吸收动力学研究[J].*中草药*, 2008, 39(7):1 056.

[9] Yu B, Ruan M, Dong X, *et al.* The mechanism of the opening of the blood-brain barrier by borneol: a pharmacodynamics and pharmacokinetics combination study[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3):1 096.

[10] Yan YX, Qi NP, Zhi PC. The enhancing effect of synthetic borneol on the absorption of tetramethylpyrazine phosphate in mouse[J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(1):74.

[11] 朱丽莎,刘颖菊,谭欣玮,等.积雪草苷在大鼠体内的药理学研究[J].*中国药房*, 2010, 11(35):3 270.

[12] Guo JS, Cheng CL, Koo MW. Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in rats[J]. *Planta Med*, 2004, 70(12):1 150.

[13] 葛朝莉,韩漫夫,白润涛,等.冰片促进血脑屏障开放的超微结构研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2008, 6(10):1 183.

[14] 朱国栋.冰片开放血脑屏障及通过P糖蛋白介导的机制研究[D].广州:广州医学院,2009.

(收稿日期:2016-05-10 修回日期:2016-08-15)
(编辑:刘明伟)