

冰片对黄芪甲苷和三七总皂苷配伍有效成分在脑缺血/再灌注模型大鼠脑组织分布的影响

刘晓丹, 杨筱倩[#], 唐 三, 丁 煌, 黄小平*, 邓常清*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 探讨冰片是否具有促进黄芪甲苷(AST IV)和三七总皂苷(PNS)配伍时主要有效成分透过大脑中动脉栓塞(MCAO)再灌注模型大鼠血脑屏障的作用。**方法** 大鼠随机分为假手术组、模型组、冰片组、AST IV组、PNS组、AST IV+PNS组、冰片+AST IV+PNS组, 制备MCAO再灌注大鼠模型, 以液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)测定大鼠患侧与健侧大脑皮层、小脑中AST IV和PNS有效成分(人参皂苷R_{g1}、R_{b1}和三七皂苷R₁)的含量。**结果** AST IV无论是单用还是与PNS、冰片配伍, 其口服后主要分布在大脑皮层, 尤其是患侧大脑皮层。冰片+AST IV+PNS能使患侧与健侧大脑皮层中AST IV含量显著增加。PNS单用, 其有效成分人参皂苷R_{g1}、R_{b1}和三七皂苷R₁主要分布在患侧小脑。冰片+AST IV+PNS能使患侧大脑皮层中人参皂苷R_{b1}含量显著增加, 使健侧和患侧大脑皮层中人参皂苷R_{g1}含量增加, 使大脑皮层尤其是患侧大脑皮层及小脑中三七皂苷R₁含量增加。**结论** 大鼠脑缺血再灌注后, AST IV与PNS的有效成分人参皂苷R_{b1}、R_{g1}及三七皂苷R₁在大脑皮层和小脑均有一定的分布。AST IV单用时, AST IV主要分布在大脑皮层; PNS单用时, 人参皂苷R_{b1}、R_{g1}及三七皂苷R₁主要分布在小脑。冰片与AST IV、PNS合用后, 能促进AST IV及人参皂苷R_{b1}、R_{g1}及三七皂苷R₁向大脑皮层富集, 尤其是向缺血再灌注侧大脑皮层富集; 而且能不同程度地促进AST IV, 人参皂苷R_{b1}、R_{g1}及三七皂苷R₁在大脑皮层的吸收, 尤其是在患侧大脑皮层的吸收。

关键词: 脑缺血再灌注; 冰片; 黄芪甲苷; 三七总皂苷; 配伍; 血脑屏障; 药物吸收; 人参皂苷R_{b1}; 人参皂苷R_{g1}; 三七皂苷R₁

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)07-1649-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.023

Study on borneol combined with astragaloside IV and *Panax notoginseng* saponins promoting bioactive components into brain in cerebral ischemia/reperfusion model of rats

LIU Xiao-dan, YANG Xiao-qian, TANG San, DING Huang, HUANG Xiao-ping, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardio-Cerebral Diseases, Key Laboratory of Hunan University for Cell Biology and Molecular Techniques, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To investigate whether borneol can promote the bioactive components of the combination of astragaloside IV (AST IV) and *Panax notoginseng* saponins (PNS) into the blood-brain barrier of rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO)/reperfusion. **Methods** Using the model of MCAO/reperfusion, rats were randomly divided into sham-operation group,

收稿日期: 2019-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573875); 湖南省自然科学基金项目(2018JJ3382); 湖南省中医药管理局重点项目(201509); 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划——中医脑病临床研究中心(2017SK4005); “中医药防治心脑血管疾病基础研究”湖南省自然科学创新群体基金

作者简介: 刘晓丹(1985—), 实验师, 主要研究方向为心脑血管疾病的中医药防治。E-mail: 314086131@qq.com

***通信作者** 黄小平(1974—), 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心脑血管疾病防治及中药组(成)分配伍研究。

Tel: (0731)88458201 E-mail: 569229858@qq.com

邓常清(1963—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。

Tel: (0731)88458710 E-mail: dchangq@sohu.com

#并列第一作者 杨筱倩(1991—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为心脑血管疾病及中药组(成)分配伍研究。E-mail: 374026259@qq.com

model group, borneol group, AST IV group, PNS group, AST IV + PNS group and borneol + AST IV + PNS group, and the content of AST IV and the bioactive components of PNS (ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and notoginsenoside R₁) in the cerebral cortex and the cerebellum of the affected side and the healthy side were determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS).

Results AST IV, whether used alone or combined with PNS and borneol, was mainly distributed in the cerebral cortex after oral administration, especially in the affected cerebral cortex. Borneol combined with AST IV and PNS significantly increased the content of AST IV in the affected and the healthy cerebral cortex. The bioactive components of PNS such as ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and notoginsenoside R₁ was mainly distributed in the affected side of the cerebellum when PNS was used alone. Borneol combined with AST IV + PNS significantly increased the content of ginsenoside Rb₁ in the cerebral cortex, especially in the affected cortex, increased the content of Rg₁ in the healthy and the affected cortex, and increased the content of notoginsenoside R₁ in the cerebral cortex, especially in the affected cortex, as well as in the cerebellum. **Conclusion** AST IV and the bioactive components of PNS such as ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and notoginsenoside R₁ have a certain distribution in the cerebral cortex and the cerebellum after cerebral ischemia-reperfusion in rats. AST IV was mainly distributed in the cerebral cortex when it was used alone, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and notoginsenoside R₁ were mainly distributed in the cerebellum when PNS was used alone. The combination of borneol combined with AST IV and PNS can promote the gather of AST IV, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and notoginsenoside R₁ to the cerebral cortex, especially to the cortex of the ischemia-reperfusion side; Moreover, it can promote the absorption of AST IV, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, and notoginsenoside R₁ in the cerebral cortex to varying degrees, especially in the affected cortex.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion; borneol; astragaloside IV; *Panax notoginseng* saponins; combination; blood-brain barrier; drug absorption; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rg₁; notoginsenoside R₁

缺血性脑卒中是临床常见疾病,其病机特点表现为本虚标实。现代中医临床研究认为,脑缺血的基本病机是虚、火、风、痰、气、血,其病机以气虚和血瘀为主,气虚血瘀为缺血性脑卒中的主要病机,因而,益气活血法是其治疗的基本方法。黄芪 *Astragali Radix* 和三七 *Notoginseng Radix et Rhizoma* 是治疗心脑血管疾病的常用有效中药,黄芪具有补气升阳等作用,三七具有活血散瘀、消肿定痛等功效,二者常配伍使用,符合中医益气活血的治疗原则。研究表明,黄芪总苷(astragalosides, AST)是黄芪中具有心脑血管效应的主要药效组分,主要含黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)。三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)是三七中具有心脑血管效应的主要药效组分,主要含人参皂苷 Rg₁ (Rg₁)、Rb₁ (Rb₁) 和三七皂苷 R₁ (R₁) 等。前期研究发现 AST 和 PNS 配伍可以通过脑缺血后的多个病理生理环节协同对抗缺血性脑损伤^[1-3]。但是,AST 和 PNS 的主要成分由于相对分子质量大、脂溶性差,透过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的量少^[4-6],难以更好地在病变脑组织发挥药理作用。

冰片为龙脑香科植物龙脑香 *Dipterocarpus tubinatus* Gaertn. f. 树脂加工品或菊科植物艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 的鲜叶加工品,味辛、苦,性微寒,归心、脾、肺经,能“通诸窍,散郁火”,有开窍醒神之功,多用于卒中、痰热、神昏

窍闭等证。其主要有效成分为 1,7-三甲基-二环庚-2-醇,相对分子质量为 154.24,是小分子脂溶性单萜类化合物,常作为辅药或引经药使用以促进药物吸收及进入病变部位。研究表明,冰片可促进药物吸收进入脑组织,从而对脑缺血的治疗发挥协同增效作用^[7]。本实验根据中医药归经理论,将冰片与 AST IV 和 PNS 配伍,研究其是否能够通过促进 AST IV 和 PNS 的药物成分透过 BBB,提高脑组织中药物有效成分的浓度,更好地发挥其抗脑缺血的作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

冰片(质量分数 86%,批号 20160506,购自湖北俊辉药业有限公司);对照品 AST IV(质量分数≥98%,批号 MUST-17022804)、PNS(质量分数≥98%,批号 MUST-17060601)、Rg₁(质量分数≥98%,批号 MUST-17030829)、Rb₁(质量分数≥98%,批号 MUST-17022510)、R₁(质量分数≥98%,批号 MUST-17071228)均购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇、乙腈(上海麦克林生化科技有限公司);水合氯醛(梯希爱化成工业发展有限公司)。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(动物合格证号 43004700037715)。饲养于湖南中医药大学动

物实验中心, 实验动物许可证号 SKY (湘) 2013-0005。实验前适应性喂养 5~7 d, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

1.3 仪器

DS1000 高效组织细胞样品处理系统 (湖北新纵科病毒疾病工程技术有限公司); 1290-6460 型超高效液相色谱-三重四级质谱联用仪 (安捷伦公司); UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱 (Waters 公司)。

2 方法

2.1 大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) /再灌注模型制备

采用改良 Longa 法^[8]制作 MCAO 局灶性脑缺血模型。大鼠用 10%水合氯醛 (0.35 g/kg) ip 麻醉。于颈前正中位置备皮、消毒, 切开 3 cm 左右切口, 钝性分离右侧颈总动脉 (common carotid arteries, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、颈内动脉 (internal carotid artery, ICA), 用 5~0 手术线分别结扎 ECA 的远心端并于结扎点近侧凝断 ECA 及其分支, 并对 ICA 远心端进行活结结扎; 动脉夹夹闭 ICA 远心端与 CCA, 以直径 0.28 mm 的尼龙线线栓自 ECA 经 CCA 与 ICA 分叉部插入 ICA, 松开 ICA 上的动脉夹, 并将线栓插入 ICA 颅内段, 插入长度为 (18±2) mm, 到达大脑中动脉环, 扎住 ICA 内的线栓以防止出血和线栓移动。逐层缝合颈部皮肤。阻断 2 h 后, 拔出线栓进行再灌注 22 h。假手术组仅将 CCA、ECA、ICA 游离出来, 不做结扎、插线处理, 其他操作同模型组。

2.2 分组及给药

根据前期实验结果^[9], 将动物随机分为假手术组 ($n=6$)、模型组 ($n=6$)、冰片 (15 mg/kg) 组 ($n=6$)、AST IV (20 mg/kg) 组 ($n=4$)、PNS (PNS 50 mg/kg) 组 ($n=4$)、AST IV+PNS (20 mg/kg+50 mg/kg) 组 ($n=4$)、冰片+AST IV+PNS (15 mg/kg+20 mg/kg+50 mg/kg) 组 ($n=4$)。各给药组大鼠于造模前 2 d 开始 ig 给药, 每天 2 次, 给药间隔 12 h。药物用时以 0.5%羧甲基纤维素钠配成相应质量浓度混悬液。模型组 ig 等量 0.5%羧甲基纤维素钠。第 3 天给药 1 h 后行缺血 2 h 再灌注 22 h, 术后继续同前给药。再灌注结束后处死大鼠, 取缺血侧和对侧脑组织, 以生理盐水洗净血液后, 在脑立体定位仪上分离大脑皮质和小脑, 大脑皮质定位于缺血侧前脑缺血区皮质和对侧对应皮质, 取视交

叉后 2~6 mm 区域皮质脑组织作为患侧和健侧皮质分别测定; 取完整小脑, 在正中切开, 分别作为患侧和健侧小脑进行药物含量检测。以液相色谱-质谱联用法 (LC-MS/MS) 测定 AST IV 和 PNS 有效成分 Rg₁、Rb₁、R₁ 的含量。

2.3 LC-MS/MS 法测定大鼠脑组织中 AST IV 及 PNS 有效成分含量

2.3.1 脑组织样本处理 精密称定大鼠脑组织样本 0.2 g 置于 2 mL 离心管, 加入 500 μL 生理盐水和 2 个钢珠, 用高效组织细胞样品处理系统振荡 30 s 破碎, 再加入 500 μL 甲醇振荡 2 min, 15 000 r/min 离心 5 min, 取 500 μL 上清液, 氮气吹干后, 加入水-乙腈 (50:50) 500 μL 复溶, 振荡 5 min 后, 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 滤膜后测定。

2.3.2 LC-MS 分析条件

(1) 色谱条件: 采用 UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, waters) 色谱柱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B)。梯度洗脱程序为: 0~1 min, 10%~25% B; 1~4 min, 25%~30% B; 4~6 min, 30%~60% B; 6.1~8 min, 60%~85% B, 8.1~11 min, 85%~10% B; 柱温 30 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 10 μL。

(2) 质谱条件: 质谱检测采用电喷雾离子化 (ESI) 负离子模式, 多反应监测 (MRM) 方式。毛细管电压 3.5 kV, 离子源干燥气温度 345 °C, 干燥气体积流量 12 L/min, 喷雾器压力为 310 kPa。检测条件见表 1。

空白脑组织、基质对照品及冰片与 AST IV、PNS 配伍后患侧小脑 4 种有效成分的 MRM 色谱图见图 1。基质对照品中 4 种成分的质谱图见图 2。

2.3.3 对照品溶液制备 分别精密称定对照品 Rg₁、Rb₁、R₁ 及 AST IV 5 mg 置于 25 mL 量瓶, 用甲醇溶解并配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品储备液备用。分别取 0.5 mL 对照品储备液置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度得 1 μg/mL 混合对照品溶液, 再采用逐级稀释法配制得 500、250、200、100、50、20、10、5、2.5、2、1 ng/mL 的对照品溶液。

2.3.4 方法学考察

(1) 标准曲线和线性范围: 精密称定空白脑组织 0.2 g, 加入 500 μL 生理盐水, 超声破碎后分别加入 500、250、200、100、50、20、10、5、2.5、2、1 ng/mL 的混合对照品溶液 500 μL, 涡旋 2 min 后,

表 1 脑组织样品中 4 种有效成分的 LC-MS 分析条件

Table 1 Analysis conditions of four effective components in brain tissue by LC-MS/MS

有效成分	t_R /min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞电压/V	碰撞能/V
Rg ₁	3.52	845.5	799.4	194	22
	3.52	845.5	637.4	194	30
Rb ₁	6.01	1 107.6	179.1	194	58
	6.01	1 107.6	118.9	194	58
R ₁	3.18	931.5	799.4	260	30
	3.18	931.5	637.4	260	38
AST IV	6.38	829.5	783.4	194	22
	6.38	829.5	393.2	194	22

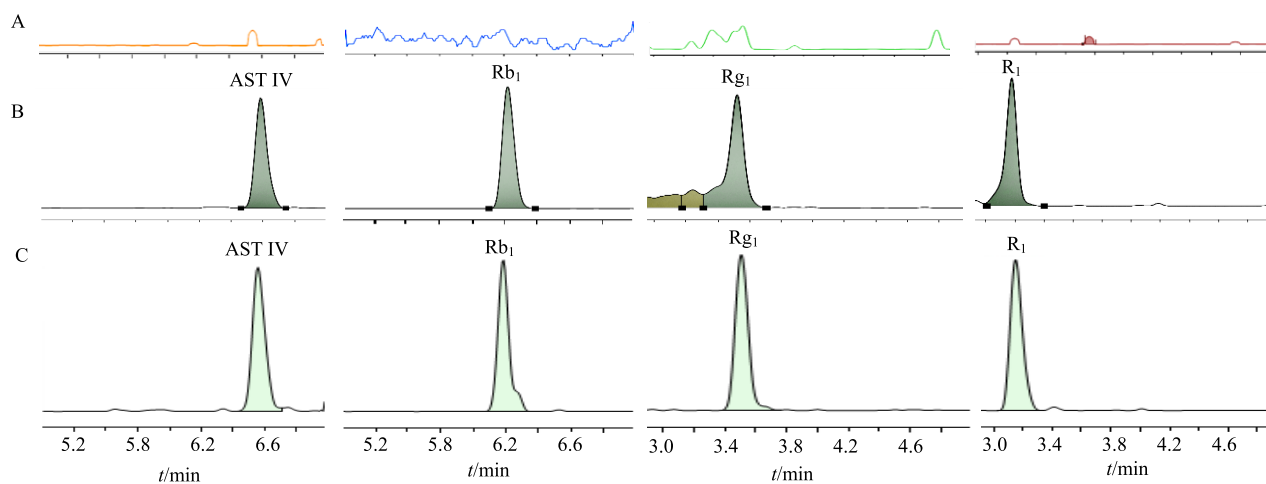


图 1 空白脑组织 (A)、基质对照品溶液 (B) 及冰片与 AST IV、PNS 配伍组大鼠患侧小脑 (C) 中 4 种有效成分的 MRM 色谱图
Fig. 1 MRM chromatogram of four bioactive components in blank brain tissues (A), reference matrix solution (B), and affected cerebellum of rats of borneol combined with AST IV and PNS group (C)

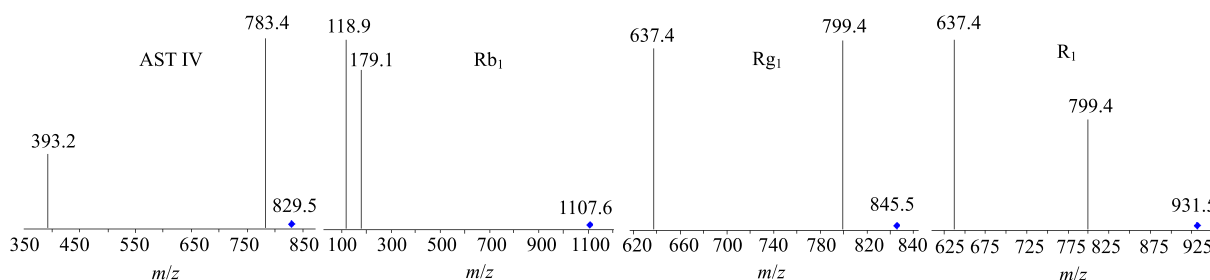


图 2 对照品基质溶液中 4 种有效成分 MRM 离子对质谱图

Fig. 2 MRM ion-pair mass spectrometry of four bioactive components in reference matrix solution

15 000 r/min 离心 5 min, 取 500 μ L 上清液, 氮气吹干后, 加入水-乙腈 (50 : 50) 500 μ L 复溶, 涡旋 5 min 后, 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清过 0.22 μ m 滤膜得质量浓度为 250、125、100、50、25、10、5、2.5、1.25、1、0.5 ng/mL 的基质对照品溶液。

取各质量浓度的基质对照品溶液, 参照“2.3.2”项色谱、质谱条件进行分析, 分别记录样品的峰面积。以样品的峰面积对质量浓度进行线性回归, 得

出脑组织基质对照品溶液中 4 种有效成分的标准曲线。结果表明脑组织基质对照品中 AST IV、Rb₁、Rg₁、R₁ 的线性方程分别为 $Y=47.76 X-56.80$ ($r^2=0.999 8$)、 $Y=65.76 X+41.68$ ($r^2=0.997 6$)、 $Y=143.95 X-409.48$ ($r^2=0.998 3$)、 $Y=40.66 X+9.56$ ($r^2=0.998 5$), 进样线性范围为 2.5~250 ng/mL, 线性关系良好, 最低定量限为 2.5 ng/mL。

(2) 专属性: 按“2.3.1”项下方法处理空白脑

组织，得到空白脑组织样本，按“2.3.2”项色谱、质谱条件进行分析，结果表明在 R_{g1}、R_{b1}、R₁、AST IV 的保留时间处均无明显色谱峰干扰（图 1），表明该分析方法具有很好的专属性。

(3) 精密度：取“2.3.4”项下 25 ng/mL 对照品溶液，分别在 24 h 内重复进样 6 次，48 h 内进样 6 次，按照标准曲线计算测定浓度的 RSD，AST IV、R_{b1}、R_{g1}、R₁ 的日内精密度 RSD 分别为 4.88%、8.02%、4.15%、4.31%，日间精密度 RSD 分别为 4.40%、9.03%、2.31%、6.12%，均 < 10% (n=6)，表明所建立的检测方法精密度符合含量分析要求。

(4) 定量限：取大鼠空白脑组织匀浆液，按标准曲线最低质量浓度点（2.5 ng/mL）的处理方法，平行处理 3 份样品，分别记录化合物的峰面积和信噪比 (S/N)。4 种有效成分的 S/N 均大于 10，证明该方法具有较高的检测灵敏度。

(5) 提取回收率：取大鼠空白脑组织匀浆液，分别加入不同质量浓度的 R_{g1}、R_{b1}、R₁ 和 AST IV 的甲醇溶液，配制成 R_{g1}、R_{b1}、R₁ 质量浓度为 5、25、125 ng/mL 和 AST IV 质量浓度为 5、25、100 ng/mL 的样品，计算各化合物的实际质量浓度和理论质量浓度的比值为加样回收率。结果表明，R_{g1} 的提取回收率大于 94%，R_{b1} 的提取回收率大于 84%，AST IV 的提取回收率大于 92%，R₁ 的提取回收率大于 83%，回收率良好。

(6) 基质效应：参照“2.3.2”项色谱、质谱条件进行分析，分别测定“2.3.3”项下配制的 25、50、100 ng/mL 对照品溶液和“2.3.4 (1)”项下配制的 25、50、100 ng/mL 基质对照品溶液中 4 种有效成分的峰面积，根据基质对照品溶液中与对照品溶液中有效成分峰面积比得到基质效应，结果显示 AST IV 和 R_{b1} 基质效应为 61%~79%，R_{g1} 和 R₁ 的基质效应为 50%~60%，说明该前处理方法存在较明显

和稳定的基质效应，因此本实验采用 4 种有效成分基质对照品溶液标准曲线的方法消除基质效应。结果表明 4 种有效成分基质对照品溶液标准曲线均有很好的线性，同时具有较好的回收率，可以一定程度上消除基质效应。

2.4 统计分析

数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各药物组计量资料比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐者用 LSD 检验，方差不齐者用 Dunnett T3 检验；各药物组各成分在各部位的含量比较采用配伍组设计资料的两因素方差分析。

3 结果

3.1 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 AST IV 分布及含量的影响

在 AST IV 组和冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织中，AST IV 主要分布在大脑皮层，尤其是患侧大脑皮层，与健侧和患侧小脑比较差异显著 (P < 0.01)；在 AST IV+PNS 组大鼠脑组织中，AST IV 在患侧大脑皮层最多，与其他部位比较，均有显著差异 (P < 0.01)。各给药组大鼠的 AST IV 在患侧小脑和健侧小脑的分布差异均不显著。

与 AST IV 组比较，PNS 与 AST IV 合用后各部位中 AST IV 含量显著增加 (P < 0.01)。与 AST IV 组及 AST IV+PNS 组比较，冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织健侧皮层与患侧皮层中 AST IV 含量显著增加 (P < 0.01，表 2)。

3.2 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 R_{b1} 分布及含量的影响

在 PNS 组大鼠脑组织中，R_{b1} 主要分布在患侧小脑和健侧小脑，与健侧大脑皮层和患侧大脑皮层比较差异显著 (P < 0.01)；在 AST IV+PNS 组和冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织中，R_{b1} 主要分布

表 2 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 AST IV 分布及含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effects of borneol combined with AST IV and PNS on distribution and content of AST IV in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	AST IV/(ng·g ⁻¹)			
	健侧大脑皮层	患侧大脑皮层	患侧小脑	健侧小脑
AST IV	19.18 ± 1.45 ^{**○○}	34.12 ± 1.71 ^{○○}	6.90 ± 0.39 ^{**}	6.83 ± 0.46 ^{**}
AST IV+PNS	40.07 ± 1.87 ^{▲▲**}	56.50 ± 5.76 ^{▲▲○○}	40.65 ± 5.51 ^{▲▲**}	40.13 ± 4.60 ^{▲▲**}
冰片+AST IV+PNS	56.11 ± 3.87 ^{▲▲△△**○○}	85.55 ± 8.27 ^{▲▲△△○○}	34.34 ± 5.89 ^{▲▲**}	34.25 ± 5.63 ^{▲▲**}

与 AST IV 组比较：▲▲P < 0.01；与 AST IV+PNS 组比较：△△P < 0.01；与患侧大脑皮层比较：**P < 0.01；与患侧小脑比较：○○P < 0.01

▲▲P < 0.01 vs AST IV group; △△P < 0.01 vs AST IV + PNS group; **P < 0.01 vs affected cortex; ○○P < 0.01 vs affected cerebellum

在患侧皮层, 与其他各部位比较差异显著 ($P < 0.01$)。各给药组大鼠脑组织中 Rb_1 在患侧小脑和健侧小脑的分布差异均不显著。

与 PNS 组比较, AST IV 与 PNS 合用后, 大鼠患侧大脑皮层中 Rb_1 含量显著增加 ($P < 0.01$)。与 PNS 组及 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 组大鼠大脑皮层尤其是患侧大脑皮层中 Rb_1 含量显著增加 ($P < 0.01$, 表 3)。

3.3 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 Rg_1 分布及含量的影响

在 PNS 组大鼠脑组织中, Rg_1 主要分布在患侧与健侧小脑, 与大脑皮层比较差异显著 ($P < 0.01$); 在 AST IV+PNS 组大鼠脑组织中, 患侧大脑皮层和小脑中 Rg_1 含量显著高于健侧大脑皮层 ($P < 0.01$); 在冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织中, 健侧与患侧大脑皮层中 Rg_1 含量显著高于健侧及患

侧小脑 ($P < 0.01$)。各给药组患侧小脑和健侧小脑中的 Rg_1 含量比较差异均无显著性。

与 PNS 组比较, AST IV 与 PNS 合用后, 大鼠健侧与患侧大脑皮层中 Rg_1 含量显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 PNS 组及 AST IV+PNS 组比较, 冰片与 AST IV+PNS 合用后, 大鼠健侧与患侧大脑皮层中 Rg_1 显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 表 4)。

3.4 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 R_1 分布及含量的影响

在 PNS 组和 AST IV+PNS 组大鼠脑组织中, R_1 主要分布在患侧小脑与健侧小脑 (表 5), 与大脑皮层差异显著 ($P < 0.01$); 在冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织中, R_1 主要分布在大脑皮层尤其是患侧大脑皮层中, 与健侧和患侧小脑比较差异显著 ($P < 0.01$)。各给药组患侧小脑和健侧小脑的 R_1 含量差异无显著性。

表 3 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 Rb_1 分布及含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effects of borneol combined with AST IV and PNS on distribution and content of Rb_1 in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$Rb_1/(ng \cdot g^{-1})$			
	健侧大脑皮层	患侧大脑皮层	患侧小脑	健侧小脑
PNS	19.55 ± 0.86 ^{○○}	26.32 ± 1.50 ^{○○}	47.45 ± 8.70 ^{**}	45.65 ± 5.66 ^{**}
AST IV+PNS	21.59 ± 1.75 ^{**○○}	48.32 ± 4.34 ^{▲▲○○}	32.63 ± 4.67 ^{▲▲**}	33.35 ± 5.24 ^{▲▲**}
冰片+AST IV+PNS	23.71 ± 2.09 ^{▲**}	61.22 ± 3.71 ^{▲▲▲○○}	23.27 ± 4.90 ^{▲▲▲**}	23.55 ± 4.61 ^{▲▲▲**}

与 PNS 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$; 与 AST IV+PNS 组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$; 与患侧大脑皮层比较: ** $P < 0.01$; 与患侧小脑比较: ○○ $P < 0.01$, 下同

▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs PNS group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs AST IV + PNS group; ** $P < 0.01$ vs affected cortex; ○○ $P < 0.01$ vs affected cerebellum; same as below

表 4 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 Rg_1 分布及含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effects of borneol combined with AST IV and PNS on distribution and content of Rg_1 in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$Rg_1/(ng \cdot g^{-1})$			
	健侧大脑皮层	患侧大脑皮层	患侧小脑	健侧小脑
PNS	52.01 ± 1.13 ^{○○}	56.14 ± 1.91 ^{○○}	95.26 ± 5.64 ^{**}	93.35 ± 5.55 ^{**}
AST IV+PNS	62.48 ± 5.49 ^{▲**○○}	85.05 ± 11.07 ^{▲▲}	84.67 ± 7.30 [▲]	85.34 ± 6.99 [▲]
冰片+AST IV+PNS	70.38 ± 6.10 ^{▲▲▲**○○}	121.47 ± 6.98 ^{▲▲▲○○}	48.96 ± 5.74 ^{▲▲▲**}	48.79 ± 5.55 ^{▲▲▲**}

表 5 冰片与 AST IV、PNS 配伍对 MCAO/再灌注模型大鼠脑组织 R_1 分布及含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effects of borneol combined with AST IV and PNS on distribution and content of R_1 in brain tissues of MCAO/reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$R_1/(ng \cdot g^{-1})$			
	健侧大脑皮层	患侧大脑皮层	患侧小脑	健侧小脑
PNS	25.69 ± 1.89 ^{**○○}	38.85 ± 2.66 ^{○○}	59.62 ± 5.44 ^{**}	58.74 ± 4.52 ^{**}
AST IV+PNS	36.64 ± 0.50 ^{▲▲○○}	38.51 ± 2.12 ^{○○}	42.69 ± 1.87 ^{▲▲**}	43.12 ± 1.67 ^{▲▲**}
冰片+AST IV+PNS	87.60 ± 3.12 ^{▲▲▲**○○}	133.21 ± 4.04 ^{▲▲▲○○}	65.34 ± 4.48 ^{▲▲▲**}	66.18 ± 4.46 ^{▲▲▲**}

与 PNS 组比较, AST IV 与 PNS 合用后, 大鼠健侧大脑皮层中 R_1 含量显著增加 ($P < 0.01$)。与 PNS 组及 AST IV+PNS 组比较, 冰片+AST IV+PNS 组大鼠脑组织各部位 R_1 含量显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 表 5)。

4 讨论

脑卒中由于高发病率和致残率, 已经成为 21 世纪威胁人类健康的一大杀手, 其中 85% 的脑卒中是由缺血引起^[10]。BBB 是血液与脑组织之间的一道天然屏障, 其有利于维持脑内环境的相对稳定, 但同时也阻碍了约 98% 的小分子药物和几乎 100% 的大分子药物向脑内的递送, 成为脑部疾病诊断和治疗的主要阻碍。如何克服 BBB 的屏障作用, 将药物有效地递送至脑内, 成为脑部疾病药物治疗的关键和研究热点。药用冰片包括冰片 (以樟脑、松节油等为原料, 经化学方法合成的精制品)、天然冰片 (樟科植物樟的新鲜枝、叶的提取加工品)、艾片 (菊科植物艾纳香叶提取的结晶) 3 种。冰片根据其来源不同有左旋龙脑和右旋龙脑之分, 主治热病神昏、惊厥、卒中痰厥、气郁暴厥、中恶昏迷、胸痹心痛、目赤、口疮、咽喉肿痛、耳道流脓^[11]。现代研究证实, 冰片易透过各类生理屏障, 在血中和脑中都可以被迅速的吸收并代谢。李伟荣等^[12-13] 给予小鼠天然冰片 5 min 后即在脑内测得冰片, 60 min 后浓度达到峰值。冰片不仅能透过 BBB, 还可与其他药物合用提高药物经不同途径给药后的入脑量^[14]。冰片与头孢曲松^[15]、尼莫地平^[16]、羟基红花黄色素 A (HSYA)^[17]、丹参酮^[18]、京尼平苷^[19-20]、山柰酚^[21]等药物合用, 能够促进这些药物经注射给药跨 BBB 入脑, 提高其在脑组织的含量。此外, 以冰片修饰脂质体、固体脂质纳米粒后静脉给药, 也能实现对包载药物的“引药上行”作用^[22-23]。冰片对 BBB 通透性的影响有如下特点^[7]: ①不同来源冰片旋光性差异对作用效果无显著影响; ②冰片对生理性 BBB 能开放其通透性, 其促 BBB 开放的作用不会引起脑的病理性损害, 是有限度、有选择而又无损伤 (或低损伤) 开放; ③冰片对于不同大脑疾病模型的 BBB 均能降低其通透性; ④冰片配伍其他药物有促进药物透过病理性 BBB 的作用。

本研究结果显示, 大鼠脑缺血再灌注后, 不管是 AST IV 单用, 还是与 PNS、冰片合用, AST IV 均主要分布在大脑皮层, 尤其是患侧大脑皮层。PNS 与 AST IV 合用, 能增加大鼠脑组织各部位中 AST

IV 的量, 配伍冰片后, 可进一步使健侧皮层与患侧皮层中 AST IV 含量增加。说明冰片配伍 AST IV 与 PNS, 能够更好地促进 AST IV 入脑, 促进 AST IV 在大脑皮层的富集。

PNS 单用时, 其有效成分 R_{b1} 主要分布在患侧小脑与健侧小脑。AST IV 与 PNS 合用后, 可使患侧大脑皮层中 R_{b1} 含量增加, 冰片与 AST IV+PNS 合用后, 可进一步使大脑皮层尤其是患侧大脑皮层中 R_{b1} 含量增加。说明 PNS 单用时, R_{b1} 主要分布在小脑, 而 PNS 与 AST IV、冰片合用后, 可促进 R_{b1} 在患侧大脑皮层的富集, 促进 R_{b1} 在大脑皮层尤其是缺血再灌注侧大脑皮层的吸收。

PNS 单用时, R_{g1} 主要分布在患侧与健侧小脑。AST IV 与 PNS 合用后, R_{g1} 则富集在患侧大脑皮层、健侧与患侧小脑, 配伍冰片后, R_{g1} 向患侧大脑皮层和健侧大脑皮层, 尤其向患侧大脑皮层富集。AST IV 与 PNS 合用后, 健侧大脑皮层与患侧大脑皮层中 R_{g1} 含量增加, 配伍冰片后, 健侧大脑皮层与患侧大脑皮层中 R_{g1} 含量进一步增加。说明 PNS 配伍 AST IV 后, 可促进 R_{g1} 在健侧和患侧大脑皮层的富集, 且配伍冰片后效果更强。

在 PNS 组和 AST IV+PNS 组, R_1 主要分布在患侧小脑与健侧小脑, 在冰片+AST IV+PNS 组, R_1 主要分布在大脑皮层, 尤其患侧大脑皮层。AST IV 与 PNS 合用后, 健侧皮层中 R_1 含量显著增加, 冰片与 AST IV+PNS 合用后, 健侧大脑皮层中 R_1 含量进一步增加, 同时患侧大脑皮层、健侧小脑与患侧小脑中 R_1 含量增加。说明 PNS 单用, 其有效成分 R_1 主要分布在小脑, 冰片配伍 PNS、AST IV 后, 可促进 R_1 向大脑皮层尤其向患侧大脑皮层的富集, 促进 R_1 进入脑组织。

以上结果表明, 大鼠脑缺血再灌注后, AST IV 与 PNS 的有效成分 R_{b1} 、 R_{g1} 及 R_1 在大脑皮层和小脑均有一定的分布。AST IV 单用时, AST IV 主要分布在大脑皮层, 尤其是患侧大脑皮层。PNS 单用时, 其有效成分 R_{b1} 、 R_{g1} 及 R_1 主要分布在小脑。冰片与 AST IV、PNS 合用后, 能促进 AST IV、 R_{b1} 、 R_{g1} 及 R_1 向大脑皮层的富集, 尤其是向缺血再灌注侧大脑皮层的富集。这对于提高缺血局部脑组织药物浓度, 更好地发挥其药理效应具有促进作用。

参考文献

- [1] 李静娴, 杨筱倩, 唐 标, 等. 黄芪甲苷和三七总皂苷配伍抗大鼠脑缺血再灌注损伤及其药动学的研究 [J].

- 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3786-3794.
- [2] Huang X P, Tan H, Chen B Y, *et al.* Combination between total *Astragalus* extract and total *Panax notoginseng* saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(6): 445-452.
- [3] Huang X P, Ding H, Lu J D, *et al.* Effects of the combination of the main active components of *Astragalus* and *Panax notoginseng* on inflammation and apoptosis of nerve cell after cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1419-1438.
- [4] Chang Y X, Sun Y G, Li J, *et al.* The experimental study of *Astragalus membranaceus* on meridian tropism: The distribution study of astragaloside IV in rat tissues [J]. *J Chromatogr Aphy B*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.10.024.
- [5] Zhang W D, Zhang C, Liu R H, *et al.* Preclinical pharmacokinetics and tissue distribution of a natural cardioprotective agent astragaloside IV in rats and dogs [J]. *Life Sci*, 2006, 79(8): 808-815.
- [6] Liu H, Yang J, Du F, *et al.* Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(12): 2290-2298.
- [7] 汪宏锦, 吴俊杰, 薛强, 等. 冰片对血脑屏障通透性的双向调节作用影响因素及机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2200-2205.
- [8] 顾振, 韩群颖, 苏殿三, 等. 大鼠短暂性局灶性脑缺血模型改进的制作方法 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2001, 21(6): 513-514.
- [9] 杨筱倩, 陈仙蕾, 杨仁义, 等. 冰片配伍黄芪甲苷与三七总皂苷抗脑缺血再灌注损伤有效剂量的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(4): 39-44.
- [10] Meairs S, Wahlgren N, Dirnagl U, *et al.* Stroke research priorities for the next decade—a representative view of the European scientific community [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2006, 22(2/3): 75-82.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 李伟荣, 陈瑞玉, 黄天来, 等. 天然冰片对小鼠脑内氨基酸类神经递质含量的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(2): 164-167.
- [13] Li W R, Chen R Y, Yang L, *et al.* Pharmacokinetics of natural borneol after oral administration in mice brain and its effect on excitation ratio [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37(1): 39-44.
- [14] 王利苹, 奉建芳, 胡凯莉. 芳香开窍中药对血脑屏障通透性的调节作用及其机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 949-955.
- [15] 魏宇宁, 刘萍, 何新荣, 等. 微透析法研究冰片对头孢曲松在大鼠脑纹状体中含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2605-2608.
- [16] 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 Pharmacokinet*, 2013, 39(1): 17-24.
- [17] 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 BBB 的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 734-737.
- [18] Lai X J, Zhang L, Li J S, *et al.* Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of three salvianolic acids after the administration of *Salvia miltiorrhizae* alone or with synthetical borneol in rats [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(6): 883-888.
- [19] Yu B, Ruan M, Cui X B, *et al.* Effects of borneol on the pharmacokinetics of geniposide in cortex, hippocampus, hypothalamus and striatum of conscious rat by simultaneous brain microdialysis coupled with UPLC-MS [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2013.01.017.
- [20] Chen Z Z, Lu Y, Du S Y, *et al.* Influence of borneol and muscone on geniposide transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-barrier *in vitro* model [J]. *Int J Pharm*, 2013, 456(1): 73-79.
- [21] Zhang Q, Wu D, Wu J, *et al.* Improved blood-brain barrier distribution: Effect of borneol on the brain pharmacokinetics of kaempferol in rats by *in vivo* microdialysis sampling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2015.01.003.
- [22] Ren J G, Zou M J, Gao P, *et al.* Tissue distribution of borneol-modified ganciclovir-loaded solid lipid nanoparticles in mice after intravenous administration [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 83(2): 141-148.
- [23] Zhang L, Han L M, Qin J, *et al.* The use of borneol as an enhancer for targeting aprotinin-conjugated PEG-PLGA nanoparticles to the brain [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(10): 2560-2572.