

## 冰片衍生物对血脑屏障通透性影响的研究

陈传兵, 刘昌辉, 伍海涛, 张荣, 赵威, 李伟荣, 杨蕾, 宓穗卿, 王宁生

(广州中医药大学, 广东广州 510405)

**摘要:**【目的】探讨10种合成的冰片衍生物对血脑屏障通透性的影响。【方法】采用多功能酶标仪检测小鼠脑组织中伊文思蓝的含量来评价2-氯苯甲酸冰片酯、3,5-二硝基苯甲酸冰片酯、3-硝基苯甲酸冰片酯、4-硝基苯甲酸冰片酯、1-萘乙酸冰片酯、4-氯苯甲酸冰片酯、苯甲酸冰片酯、3-甲基苯甲酸冰片酯、4-甲基苯甲酸冰片酯、三氯乙酸冰片酯10种冰片衍生物的血脑屏障通透性效果。【结果】酶标仪法测定结果显示,10种冰片衍生物中只有2-氯苯甲酸冰片酯的血脑屏障通透性效果显著优于右旋冰片组(阳性对照),两者具有显著性差异( $P < 0.001$ )。【结论】2-氯苯甲酸冰片酯对血脑屏障通透性具有促进作用。

**关键词:** 冰片; 衍生物; 血脑屏障; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)06-1214-03

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.06.024

## Studies on Effect of Borneol Derivatives on Blood-Brain-Barrier Permeability

CHEN Chuan-Bing, LIU Chang-Hui, WU Hai-Tao, ZHANG Rong, ZHAO Wei,  
LI Wei-Rong, YANG Lei, MI Sui-Qing, WANG Ning-Sheng

(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of 10 kinds of borneol derivatives on blood-brain-barrier permeability.

**Methods** A multifunctional-enzyme labeled instrument was used to determine the content of Evens blue in mice brain tissues to evaluate the effect of 10 borneol derivatives such as bornyl 2-chlorobenzoate, bornyl 3,5-dinitrobenzoate, bornyl 3-nitrobenzoate, bornyl 4-nitrobenzoate, bornyl 1-naphthylacetate, bornyl 4-chlorobenzoate, bornyl benzoate, bornyl 3-methylbenzoate, bornyl 4-methylbenzoate, bornyl trichloroacetate on blood-brain-barrier permeability. **Results** The result showed that only the effect of bornyl 2-chlorobenzoate in 10 borneol derivatives on blood-brain-barrier permeability was superior to borneol group (as positive control) by enzyme-labeled instrument, the difference being significant ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Bornyl 2-chlorobenzoate is effective for promoting blood-brain-barrier permeability.

**Keywords:** borneol; derivatives; blood-brain-barrier; mice

血脑屏障是多样而复杂的动态系统,它允许血液循环中脑组织所需的营养物质通过,有效地阻挡有害物质的侵入,又能将代谢产物排出,并根据脑内成分的各种需要作出反应,从而维持脑环境的恒定,保证中枢神经系统的正常结构和功能。但血脑屏障同时也阻碍了药物进入大脑,导致药物难以透过血脑屏障达到脑内有效治疗浓度,从而给脑部疾病如脑肿瘤、中枢神经系统感

染、药物成瘾性等疾病的治疗造成困难。冰片是一种常用中药,具有广泛的药理作用,如:镇痛抗炎<sup>[1]</sup>、抗菌<sup>[2]</sup>、抗血栓<sup>[3]</sup>等,最突出的是促进药物透过血脑屏障的作用<sup>[4-5]</sup>。在长期的临床用药中,冰片自身存在的弱点逐渐显露出来,如药效作用不强、刺激性大、挥发性强<sup>[6]</sup>,并存在一定毒副作用等<sup>[7]</sup>特点,这些成为了影响冰片临床应用的主要因素。为了降低冰片毒副作用,增强药效,课题

收稿日期: 2020-09-11

作者简介: 陈传兵(1977-),男,博士,副教授; E-mail: henchuanbing@gzucm.edu.cn

基金项目: 社会发展领域科技计划项目(编号: 011B031700069); 广东省中药有效性与安全性研究重点实验室开放基金资助项目(编号: kf07005); 广州中医药大学创新基金资助项目(编号: 2007C002)

组前期对冰片进行结构修饰, 合成了多个未见文献报道的冰片衍生物<sup>[8-9]</sup>, 并研究了冰片衍生物的镇痛作用<sup>[10]</sup>和对惊厥模型小鼠氨基酸类神经递质的影响<sup>[11]</sup>。本研究通过比较10种冰片衍生物与冰片在小鼠体内透血脑屏障效果, 筛选药效作用较强、不易挥发, 毒副作用较低冰片衍生物, 为开发新一代透血脑屏障药物提供实验依据, 这对于拓展冰片的应用范围, 对脑靶向给药系统的研究和脑部疾病的治疗具有较大的参考价值。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方 法

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重(18 ± 5)g, 由广东省卫生厅实验动物中心提供, 动物质量合格证号: SCKK 粤 2008-0002。适应性喂养3 d(温度 20~25 ℃, 湿度 60%~70%)后, 用于实验。给药前小鼠禁食过夜, 自由饮水。

1.2 药物与试剂 2-氯苯甲酸冰片酯、3,5-二硝基苯甲酸冰片酯、3-硝基苯甲酸冰片酯、4-硝基苯甲酸冰片酯、1-萘乙酸冰片酯、对氯苯甲酸冰片酯、苯甲酸冰片酯、3-甲基苯甲酸冰片酯、4-甲基苯甲酸冰片酯、三氯乙酸冰片酯(冰片衍生物均为本课题组自制, 纯度大于98%); 5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 吐温-80, 右旋冰片(含量97.5%, 江西吉安林科天然冰片厂生产, 使用前研粉, 过100目筛备用)。医用酒精, 生理盐水、丙酮、伊文思蓝(购自广州东巨化学试剂公司, 均为分析纯)。

1.3 仪器 AUM2200电子分析天平(日本 Shimadzu 公司); KDC-220HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司); EnSpire 多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.4 药液配制 精密称取0.4 g伊文思蓝转移入100 mL容量瓶中, 加生理盐水定容至刻度线即得0.4%溶液(*w/v*); 丙酮和生理盐水混匀(7:3)(*v:v*)即得用于匀浆的混合液。各精密称取2-氯苯甲酸冰片酯、3,5-二硝基苯甲酸冰片酯、3-硝基苯甲酸冰片酯、4-硝基苯甲酸冰片酯、1-萘乙酸冰片酯、4-氯苯甲酸冰片酯0.5 g, 研磨后各加5% CMC-Na助溶配成悬浮液(50 mg/mL); 各精密称取0.5 g苯甲酸冰片酯、3-甲基苯甲酸冰片酯、4-甲基苯甲酸冰片酯、三氯乙酸冰片酯, 研磨后加5%吐温-80助溶配成溶液(50 mg/mL); 精密称取0.5 g

右旋冰片2份, 一份研磨后加10 mL 5% CMC-Na助溶配成浓度为50 mg/mL的悬浮液, 另一份研磨后加入10 mL 5%吐温-80助溶配成浓度为50 mg/mL的溶液。

1.5 伊文思蓝标准曲线绘制 用空白小鼠脑浆配制伊文思蓝倍释系列浓度溶液0、1、2、5、10、20、50 μg/g, 用酶标仪于630 nm波长处检测光密度, 求得标准曲线。

1.6 分组与给药方法 根据药物的溶解性, 采用2种溶剂作对照, 即CMC-Na组和吐温-80组。其中: CMC-Na组包括5%CMC-Na溶剂组、右旋冰片(阳性对照)组、2-氯苯甲酸冰片酯组、4-氯苯甲酸冰片酯组、3-硝基苯甲酸冰片酯组、4-硝基苯甲酸冰片酯组、3,5-二硝基苯甲酸冰片酯、1-萘乙酸冰片酯组, 每组16只, 雌雄各半; 吐温-80组包括吐温-80溶剂组、右旋冰片组(阳性对照)、苯甲酸冰片酯组、3-甲基苯甲酸冰片酯组、4-甲基苯甲酸冰片酯组、三氯乙酸冰片酯组, 每组16只, 雌雄各半。

1.7 透血脑屏障作用实验 小鼠按体质量(0.02 mL/g)灌服给药60 min后, 于尾静脉注射0.4%伊文思蓝溶液(10 mL/kg), 2 min后断头取脑, 脑组织用生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 称质量, 按1:8(*w:v*)加入丙酮-生理盐水(7:3)(*v:v*)匀浆, 匀浆液于70 ℃孵育0.5 h, 以3 000 r/min离心15 min, 取200 μL上清液, 用酶标仪于630 nm波长处检测其光密度。

1.8 统计方法 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析, 计量资料结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两两比较用LSD检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 伊文思蓝的标准曲线 见图1。酶标仪法:  $y = 0.0105x + 0.0503$ ,  $R^2 = 0.9996$ 。结果表明线性关系良好, 符合生物样品测定要求。

2.2 酶标仪法测定冰片衍生物开放血脑屏障作用实验结果 用CMC-Na作助溶剂的冰片衍生物中, 2-氯苯甲酸冰片酯组血脑屏障通透性效果显著优于右旋冰片组(阳性对照), 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); 4-硝基苯甲酸冰片酯和1-萘乙酸冰片酯组效果与右旋冰片组相当, 差异无统计学

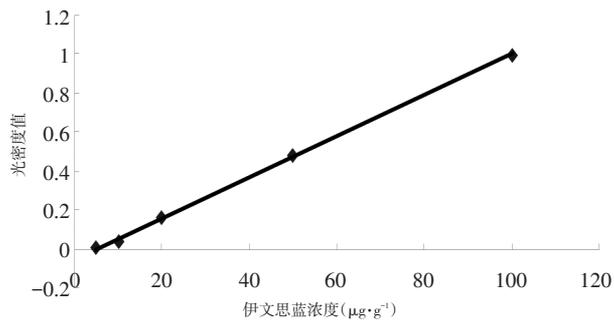


图1 伊文思蓝标准曲线(酶标仪法)

Figure 1 Evens blue standard curve (enzyme-labeled instrument method)

意义( $P > 0.05$ ); 而4-硝基苯甲酸冰片酯组、3,5-二硝基苯甲酸冰片酯组、1-萘乙酸冰片酯的效果显著低于右旋冰片组。具体结果见表1。

表1 用CMC-Na作助溶剂的冰片衍生物对小鼠血脑屏障通透性的影响

Table 1 Effect of borneol derivatives dissolved in CMC-Na on blood-brain-barrier permeability in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	鼠数(只)	脑质量(g)	脑内伊文思蓝浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
CMC-Na	16	0.35 ± 0.05	11.14 ± 1.79
右旋冰片	16	0.36 ± 0.05	21.26 ± 3.76 <sup>②</sup>
3-硝基苯甲酸冰片酯	16	0.37 ± 0.05	16.92 ± 4.04 <sup>①</sup>
4-硝基苯甲酸冰片酯	16	0.35 ± 0.04	19.41 ± 4.04 <sup>②</sup>
3,5-二硝基苯甲酸冰片酯	16	0.35 ± 0.04	15.95 ± 3.32 <sup>①</sup>
2-氯苯甲酸冰片酯	16	0.36 ± 0.03	28.95 ± 3.56 <sup>②③</sup>
4-氯苯甲酸冰片酯	16	0.36 ± 0.04	11.90 ± 2.58
1-萘乙酸冰片酯	16	0.35 ± 0.04	23.05 ± 4.93 <sup>②</sup>

① $P < 0.05$ , ② $P < 0.001$ , 与CMC-Na比较; ③ $P < 0.001$ , 与右旋冰片组比较

用吐温-80作助溶剂的冰片衍生物中, 各药物组与右旋冰片组(阳性对照)相比, 效果相当, 无显著性差异( $P > 0.05$ ), 具体结果见表2。

### 3 讨论

本实验结果表明: 在10种冰片衍生物中, 只有2-氯苯甲酸冰片酯的血脑屏障通透性优于右旋冰片; 苯甲酸冰片酯、3-甲基苯甲酸冰片酯、4-甲基苯甲酸冰片酯、三氯乙酸冰片酯、4-硝基苯甲酸冰片酯和萘乙酸冰片酯效果与右旋冰片相当; 3-硝基苯甲酸冰片酯、3,5-二硝基苯甲酸冰片酯和4-氯苯甲酸冰片酯效果低于右旋冰片。2-氯苯甲酸冰片酯的血脑屏障通透性显著优于右旋冰

表2 用吐温-80作助溶剂的冰片衍生物对小鼠血脑屏障通透性的影响

Table 2 Effect of borneol derivatives dissolved in Tween-80 on blood-brain-barrier permeability in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	鼠数(只)	脑质量(g)	脑内伊文思蓝浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
吐温-80	16	0.38 ± 0.03	16.27 ± 1.45
右旋冰片	16	0.39 ± 0.03	31.73 ± 4.52 <sup>①</sup>
苯甲酸冰片酯	16	0.38 ± 0.02	25.64 ± 3.19 <sup>①</sup>
3-甲基苯甲酸冰片酯	16	0.36 ± 0.02	24.31 ± 3.41 <sup>①</sup>
4-甲基苯甲酸冰片酯	16	0.39 ± 0.03	24.97 ± 2.78 <sup>①</sup>
三氯乙酸冰片酯	16	0.39 ± 0.03	23.62 ± 2.84 <sup>①</sup>

① $P < 0.001$ , 与吐温-80组比较

片, 因此, 其有望开发成为新一代透血脑屏障的药物。

### 参考文献:

- [1] 孙晓萍, 欧立娟, 宓穗卿, 等. 冰片抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5): 353-355.
- [2] 何桂芳, 宋友文, 文晓娟, 等. 冰片注射液体外抑菌试验观察[J]. 中兽医学杂志, 2009(1): 10-11.
- [3] LI Y H, SUN X P, ZHANG Y Q, et al. The antithrombotic effect of borneol related to its anticoagulant property [J]. Am J Chin Med, 2008, 36(4): 719-727.
- [4] 陈艳明, 王宁生. 冰片对血脑屏障体外模型细胞间紧密连接和细胞吞饮囊泡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(7): 632-634.
- [5] YIN Y, CAO L, GE H F, et al. L-Borneol induces transient opening of the blood-brain barrier and enhances the therapeutic effect of cisplatin[J]. Neuroreport, 2017, 28(9): 506-513.
- [6] 姜祎, 徐虹, 孔凡荣, 等. 含冰片干凝胶的制备及其降低冰片挥发性作用[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(8): 940-945.
- [7] 吴谕锋, 朱泽宇, 陈靖南, 等. 冰片药理作用及冰片酯的研究进展[J]. 药学研究, 2020, 39(4): 217-224.
- [8] 陈传兵, 王涛, 张荣, 等. 3,5-二硝基苯甲酸冰片酯的合成及结构表征[J]. 广州化学, 2012, 37(4): 23-25, 55.
- [9] 陈传兵, 伍海涛, 王涛, 等. 一种冰片衍生物的合成及结构表征[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(6): 643-644, 647.
- [10] 王涛, 张荣, 陈传兵, 等. (+)-顺丁烯二酸单冰片酯与天然冰片镇痛作用的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 53-54.
- [11] 陈瑞玉, 李伟荣, 宓穗卿, 等. 天然冰片及其结构修饰物对惊厥模型小鼠氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 282-285.

【责任编辑: 侯丽颖】