

冰片与羟苯乙酯合用的体外溶血效应

梁小雯¹, 伍海涛¹, 廖南英², 魏秀芳¹, 宓穗卿¹, 王宁生¹(1. 广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405; 2. 中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 观察冰片和羟苯乙酯单用及合用对红细胞的溶血作用。**方法** 兔耳背中动脉取血, 制成2%的红细胞悬液, 用不同浓度的冰片和羟苯乙酯与其反应, 32℃孵育30 min, 离心, 检测吸光度, 给出溶血曲线, 并用等辐射分析法和响应面法进行分析。**结果** 冰片的半数溶血浓度(HC₅₀)95%的置信区间为263.39~393.27 μg·mL⁻¹, 羟苯乙酯的 HC₅₀ 95%的置信区间为867.93~916.65 μg·mL⁻¹, 冰片和羟苯乙酯合用后, 溶血曲线左移, 合用的 HC₅₀ 点位于两药物单用 HC₅₀ 的95%置信区间内, 响应面法验证了其相加效应。**结论** 冰片和羟苯乙酯合用后溶血效应为相加作用, 临床浓度时羟苯乙酯的溶血率很低, 溶血效应主要源于冰片。

关键词: 冰片; 羟苯乙酯; 溶血实验; 体外刺激试验; 等辐射法; 响应面法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0670-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.006

In-vitro Hemolysis Test of Combination of Borneol and Ethylparaben

LIANG Xiaowen¹, WU Haitao¹, LIAO Nanying², WEI Xiufang¹, MI Suiqing¹, WANG Ningsheng¹ (1. Clinical Pharmacology Institute of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Zhongshan Ophthalmic Centre, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the hemolysis effect of borneol and ethylparaben using alone or together on the red blood cell. **Methods** Blood was sampled from the rabbit ear artery for the preparation of 2% of red blood cell(RBC) suspension. And then the RBC suspension was treated with different concentrations of borneol and ethylparaben alone or together. After 30-min incubation in 32℃, the suspension was centrifuged, the optical density was detected, and the curve of concentration-hemolysis rate was drawn and was analyzed with isobolographic analysis and response surface methods. **Results** The 95% confidence interval of borneol's HC₅₀ was 263.39~393.27 μg·mL⁻¹, while that of ethylparaben's was 867.93~916.65 μg·mL⁻¹. When borneol and ethylparaben were used together, the concentration-hemolysis rate curve moved to the left side, HC₅₀ was just among the 95% confidence interval area of borneol and that of ethylparaben. The results of response surface have proved the synergistic effect. **Conclusion** The hemolysis effect on RBC can be enhanced after borneol and ethylparaben are used together. Ethylparaben at clinical concentration shows low hemolysis rate, and the hemolysis effect mainly results from borneol.

Keywords: Borneol; Ethylparaben; Hemolysis test; In-vitro stimulation test; Isobolographic analysis; Response surface method

冰片味辛, 苦, 性微寒, 归心、脾、肺经, 具有开窍醒神、清热止痛的功效^[1], 是很多上市中药滴眼液中常添加的一味中药, 具有开放生物屏障、促药物渗透的作用^[2], 兼有轻度的镇痛、抗炎作用^[3], 并能

产生清凉的感觉, 减轻眼睛疼痛、干涩的症状^[4]。羟苯乙酯是眼用制剂中常添加的抑菌剂, 主要作用于细胞膜及竞争辅酶^[5], 对霉菌、酵母菌的抑制效果好^[6]。有研究^[7]显示, 具有促透作用的氮酮与抑菌剂合用,

收稿日期: 2014-07-19

作者简介: 梁小雯, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物体内过程及代谢。Email: 814884803@qq.com。通讯作者: 伍海涛, 博士, 研究方向: 临床药理, 眼科药理。Email: znwht@sina.com.cn。

基金项目: 广东省自然科学基金(S2011040003546); 广东省科技计划项目(2011B031700069)。

可加强抑菌剂对角膜的损害,而同样具有促渗透作用的冰片与抑菌剂合用,其联合效应尚未明确。本研究采用兔红细胞溶血实验,观察两者合用的溶血效应,利用等辐射分析法和响应面法考察作用特征,并绘制 3D 图,考察合用的溶血效果,为眼制剂处方设计提供安全剂量参考范围。

1 材料与方 法

1.1 药物及试剂 冰片,江西吉安市林科天然冰片厂,纯度>95%,批号:070806;羟苯乙酯,阿拉丁试剂有限公司,批号:20100710;乙醇与丙二醇均为分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;0.9%生理盐水,自配。

1.2 动物 新西兰大白兔,雌雄各半,体质量 2~3 kg,广东省医学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.3 仪器 2300 Enspire Multimode Plate Reader 酶标仪,美国 Perkin Elmer 公司;KDC-220HR 高速冷冻离心机,科大创新公司;LIBROR AEL-160 电子分析天平,日本 SHIMADZU 公司;TK-12D 型透皮扩散试验仪,上海锴凯科技贸易有限公司。

1.4 受试物配制 冰片研磨成细粉,称取冰片细粉约 0.15 g、羟苯乙酯约 0.60 g,分别置于 50 mL 容量瓶中,先加入 5 mL 乙醇完全溶解药物,再加入 15 mL 丙二醇混匀,最后用生理盐水定容,得到澄明的冰片母液浓度为 3000.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、羟苯乙酯母液浓度为 12000.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按照相同方法配制不含药物的上述混合溶液,即为冰片与羟苯乙酯的溶媒,临用前以溶媒稀释母液。

1.5 实验方法^[8-10] 家兔耳背中动脉取血 10 mL,滴入烧杯中,用玻璃棒迅速搅拌以除去纤维蛋白原,倒入另一个装有 70 mL 生理盐水的烧杯中混匀,1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,然后同样条件下用生理盐水洗 2 次,每次 5 min,至上清不呈红色为止,量取红细胞,加生理盐水稀释成 2% 的红细胞(Red Blood Cell, RBC)悬液,红细胞在整个操作过程中保持 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

RBC 悬液与受试物 1:1 比例于试管中混合,所有样本均做平行管,置于 32 $^{\circ}\text{C}$ 温水中孵育 30 min,取出置于冰上终止反应,800 g 离心 10 min,吸取上清液 200 μL ,置于 96 孔酶标板中,用酶标仪于 540 nm 和 575 nm 处测定吸光度。受试物种类共分为 4 组:第 1 组是冰片单用的浓度梯度(分别是 25, 50, 100, 200, 250, 315, 375, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),结果见图 1;第 2 组是羟苯乙酯单用的浓度梯度(分

别是 150, 300, 600, 750, 900, 1000, 1200, 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),其结果见图 2;第 3 组是冰片与羟苯乙酯不同配比合用的浓度(冰片的终浓度为 25, 50, 100, 200, 315 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,羟苯乙酯的终浓度为 150, 300, 600, 900, 1000, 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),结果见图 3;第 4 组是根据响应面分析法二因素的中心实验设计出冰片与羟苯乙酯合用的配比浓度,其设置及结果见表 1 及表 2。数据处理时,以生理盐水的吸光度为阴性对照,蒸馏水的为阳性对照,溶媒溶血百分率(Hemolysis Rate, HR)=($A_{\text{溶媒}} - A_{\text{生理盐水}}$)/ $A_{\text{蒸馏水}} \times 100$,样品溶血百分率(HR)=($A_{\text{样品}} - A_{\text{溶媒}}$)/ $A_{\text{蒸馏水}} \times 100$ 。血红蛋白变性率(HDR)=(A_{575}/A_{540}) $\times 100$ 。如 HDR < 90,则该物质视为血红蛋白变性阳性,结果不进行分析。每个浓度重复 3 次。

1.6 等辐射分析法^[11-13] 用 SPSS17.0 计算出冰片和羟苯乙酯单用和合用时的 HC_{50} ,用等辐射分析法进行分析:在等辐射图中,将冰片和羟苯乙酯 2 种药物单独使用时的 HC_{50} 95% 的置信区间标绘在 X、Y 轴上,相连成相加线。根据合用的实验结果,将不同配比的冰片/羟苯乙酯浓度及其相对应的 HC_{50} 浓度,描绘在同一个坐标图上。

1.7 响应曲面法^[11-14] 综合单因素影响实验结果,选取冰片和羟苯乙酯低于 HC_{50} 的浓度进行二因素的中心实验设计,冰片为 150~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,羟苯乙酯因浓度跨度较大,分为两组,一组为羟苯乙酯临床用浓度的 100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,另一组为高于临床使用浓度的 400~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以冰片浓度(A)、羟苯乙酯浓度(B)作为考察对象,采用 Design Expert 8.0 统计软件的分析面分析法安排实验,观察冰片和羟苯乙酯合用的效果,每个实验重复 2 次。实验设计和结果见表 1 和表 2。

2 结果

2.1 量效曲线 冰片单用的溶血曲线如图 1, HC_{50} 95% 的置信区间在 263.39~393.27 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;羟苯乙酯单用的溶血曲线如图 2, HC_{50} 95% 的置信区间在 867.93~916.65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;两药合用的溶血曲线如图 3,其溶血曲线较单用者左移,说明两者合用时溶血作用增强,冰片浓度越高,增强作用越明显。

2.2 等辐射分析法 如图 4 所示, A、B 点分别是冰片、羟苯乙酯单用的 HC_{50} , C~G 为冰片与羟苯乙酯不同浓度配比的合用点,合用的 HC_{50} 点均在 95% 可信限的相加线范围内,表明两者合用时作用增强,为相加作用。

2.3 响应曲面法 使用 Design Expert 8.0 对表 1 和表

表 1 冰片和羟苯乙酯合用效果的响应面设计与结果

Table 1 The response surface design and result of interaction between borneol and ethylparaben

	Factor 1	Factor 2	Response
	A. 冰片	B. 羟苯乙酯	HR
	/μg·mL ⁻¹	/μg·mL ⁻¹	%
1	150.00	400.00	34.5068
2	200.00	250.00	15.3090
3	200.00	250.00	18.0106
4	200.00	250.00	19.5661
5	250.00	400.00	90.6263
6	200.00	250.00	16.2096
7	150.00	100.00	1.0233
8	129.29	250.00	11.9525
9	270.71	250.00	93.0004
10	200.00	250.00	16.7008
11	200.00	37.87	37.9451
12	250.00	100.00	91.4859
13	200.00	462.13	54.5641

注：羟苯乙酯浓度：400.00~800.00 μg·mL⁻¹。

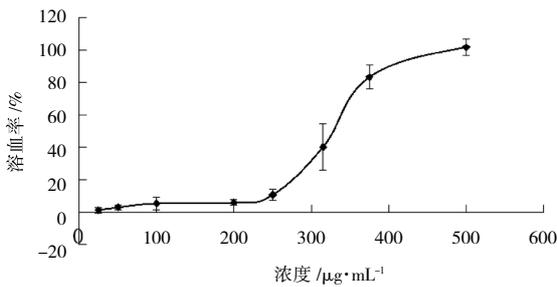


图 1 冰片浓度-溶血率曲线(n=3)

Figure 1 The curve of borneol concentration-hemolysis rate

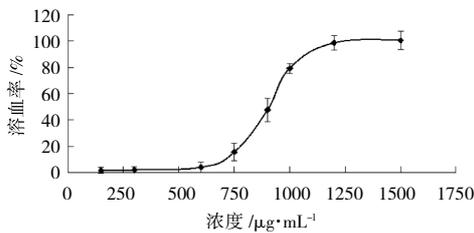


图 2 羟苯乙酯浓度-溶血率曲线(n=3)

Figure 2 The curve of ethylparaben concentration-hemolysis rate

2 中各浓度的综合权重数据进行多元性回归和二项式拟合，得二次多项回归方程：

$$HR=+74.60+17.32 \times A+18.84 \times B-12.64 \times A \times B$$

(A 为冰片, B 为羟苯乙酯)

$$HR=+17.16+32.65 \times A+7.02 \times B-8.59 \times A \times B+18.92 \times A^2+15.81 \times B^2$$

从方差分析表 3 和表 4 看出，模型回归 P 分别

表 2 冰片和羟苯乙酯合用效果的响应面设计与结果

Table 1 The response surface design and result of interaction between borneol and ethylparaben

	Factor 1	Factor 2	Response
	A. 冰片	B. 羟苯乙酯	HR
	/μg·mL ⁻¹	/μg·mL ⁻¹	%
1	200.00	317.16	26.6885
2	129.29	600.00	39.3369
3	250.00	800.00	94.2693
4	200.00	882.84	92.3864
5	200.00	600.00	84.0770
6	150.00	800.00	88.7024
7	150.00	400.00	34.5068
8	200.00	600.00	83.6676
9	200.00	600.00	84.1998
10	200.00	600.00	82.9718
11	200.00	600.00	74.6214
12	270.71	600.00	93.6963
13	250.00	400.00	90.6263

注：羟苯乙酯浓度：100.00~400.00 μg·mL⁻¹。

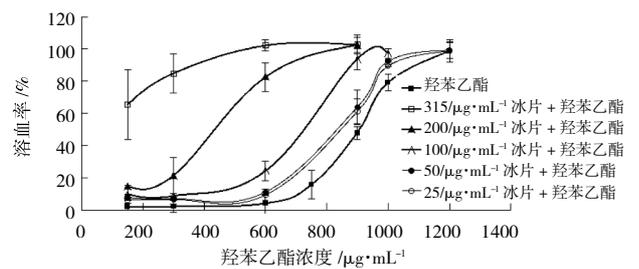


图 3 冰片和羟苯乙酯合用的浓度-溶血率曲线(n=3)

Figure 3 The concentration-hemolysis rate curve of combination of borneol and ethylparaben

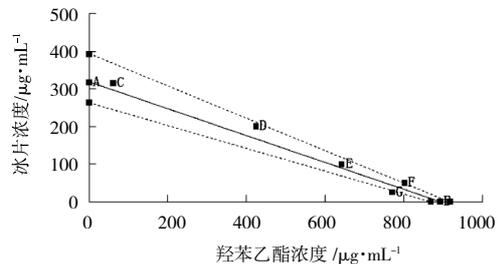


图 4 冰片和羟苯乙酯合用效果的等辐射图(n=3)

Figure 4 The isobolographic of interaction between borneol and ethylparaben

为 0.0006 和小于 0.0001，说明模型回归极显著；模型决定系数(r)分别为 0.9162 和 0.9935，表明模型拟合度良好。图 5 和图 6 显示的 3D 响应面，高浓度羟苯乙酯与冰片合用响应曲面的效果是一个较平缓的斜面；眼制剂中常用的羟苯乙酯浓度为低浓度

表 3 冰片和羟苯乙酯合用效果的方差分析表

Table 3 The analysis of variance table of statistical results

方差来源	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
模型	5879.51	3	1959.84	15.68	0.0006
A- 冰片	2399.94	1	2399.94	19.20	0.0018
B- 羟苯乙酯	2840.68	1	2840.68	22.73	0.0010
AB	638.89	1	638.89	5.11	0.0501
Residual	1124.86	9	124.98		
Lack of Fit	1057.58	5	211.52	12.58	0.0147
Pure Error	67.28	4	16.82		
Cor Total	7004.37	12			

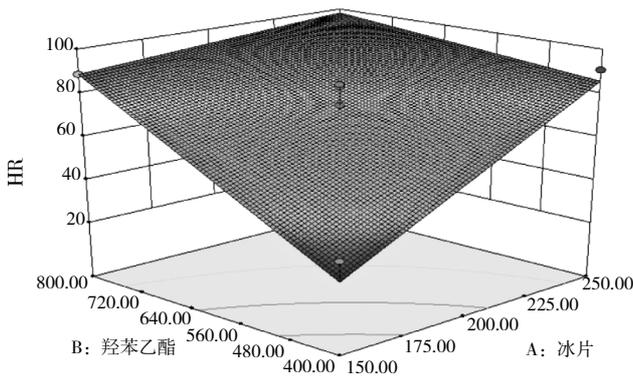
注：羟苯乙酯浓度：400.00~800.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 4 冰片和羟苯乙酯合用效果的方差分析表

Table 4 The analysis of variance table of statistical results

方差来源	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
模型	12966.64	5	2593.33	90.74	< 0.0001
A- 冰片	8528.25	1	8528.25	298.40	< 0.0001
B- 羟苯乙酯	393.77	1	393.77	13.78	0.0075
AB	294.86	1	294.86	10.32	0.0148
A ²	2490.17	1	2490.17	87.13	< 0.0001
B ²	1738.59	1	1738.59	60.83	0.0001
Residual	200.06	7	28.58		
Lack of Fit	189.01	3	63.00	22.80	0.0056
Pure Error	11.05	4	2.76		
Cor Total	13166.71	12			

注：羟苯乙酯浓度：100.00~400.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

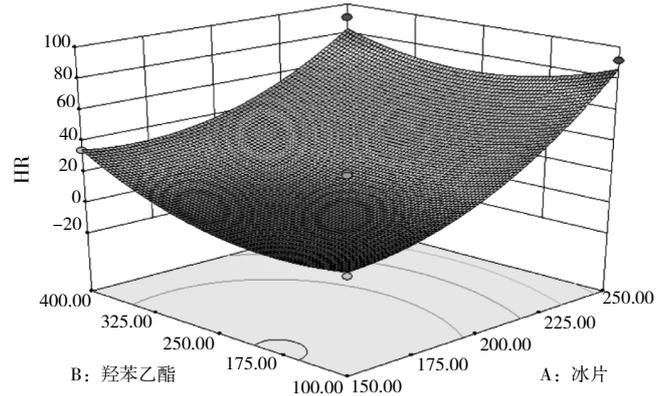


注：羟苯乙酯浓度：400.00~800.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图 5 冰片和羟苯乙酯合用效果的典型响应面 3D 图

Figure 5 The classical 3D graph of response surface of interaction between borneol and ethylparaben

(100.00 ~ 400.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，其响应面图是轻微的凹面。



注：羟苯乙酯浓度：100.00~400.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图 6 冰片和临床浓度范围羟苯乙酯合用效果的典型响应面 3D 图

Figure 6 The classical 3D graph of response surface of interaction between borneol and ethylparaben at clinical concentration

3 讨论

红细胞溶血试验，是以红细胞损伤后漏出的血红蛋白的量来评价细胞膜损伤的实验，本实验用作眼刺激试验(Draize's 试验)的替代方法，其可靠性已被验证^[8-9]。等辐射分析法是一种简单、精确分析药物之间相互作用的方法。量效曲线只能判断两药合用后效应是否增强，对其类型难以判断。等辐射分析法能定量考察药物合用后药效的改变的类型，是相加、协同还是拮抗。本实验用量效曲线与等辐射分析法结合，考察冰片与羟苯乙酯合用后的溶血效应。结果显示，不同配比的冰片和羟苯乙酯合用后，在不同梯度浓度下的 HC_{50} 点均落在相加线内，可判断其增强效应属于相加作用。

响应面法是一种利用合理的设计进行实验，采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系，寻求最优工艺参数，解决多变量问题的一种统计方法。在制剂工艺中常用于寻找物料的最优配比，也可用于阐述两个或多个变量间共同作用的效果。为全面了解冰片与羟苯乙酯的相互作用，本研究采用响应面法考察不同剂量下冰片与羟苯乙酯合用的溶血效应。实验结果验证了等辐射分析法的结论。由于羟苯乙酯的浓度跨度较大，我们在按照常规设计实验的同时，针对临床剂量范围进一步考察。高浓度羟苯乙酯与冰片合用 3D 图是一个较平缓的斜面，显示两者作用效果基本独立，交互作用较少，与等辐射分析法得到的结果吻合。眼制剂中常用的羟苯乙酯浓度为低浓度(100.00 ~ 400.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[15]，3D 图表明此时羟苯乙酯的溶血率很低，溶血效应主要源于冰片；其响应面是轻微的凹面，提示在此浓度区域范围的眼刺激性

最小。

溶血实验结果可以作为预测眼刺激性的依据,但不能完全代替眼刺激在体实验。本实验表明在各自的临床剂量范围内,羟苯乙酯与冰片的合用不会显著增加其眼刺激性。实验也为眼制剂处方设计提供安全剂量参考范围,其最适浓度范围需结合羟苯乙酯与冰片合用后的抑菌效果最终评判。

参考文献:

[1] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 405-406.

[2] 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.

[3] 孙晓萍, 欧立娟, 宓德卿, 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.

[4] 伍海涛, 王宁生, 宓德卿, 等. 眼用制剂中清凉剂的气相色谱测定方法[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(2): 190-193.

[5] 梁光江, 王延东, 叶成添, 等. 滴眼剂中常用几种抑菌剂的应用和观察[J]. 今日药学, 2010, 20(3): 43-44.

[6] 曾嵘, 阎敏, 张志刚. 羟苯乙酯在荧光素钠滴眼剂中防腐效度分析[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 761-762.

[7] Tang Liu DD, Richman JB, Weinkam RJ, et al. Effects of four

penetration enhances on corneal permeability of drugs in vitro[J]. J Pharm Sci, 1994, 83(1): 85.

[8] 廖南英, 刘启德, 宓德卿, 等. 溶血试验替代滴眼液眼刺激性试验的可行性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 648-652.

[9] 薛金玉, 杨杏芬, 杨颖, 等. 红细胞溶血实验替代兔眼刺激性实验检测农药眼刺激性初步研究[J]. 中国职业医学, 2010, 37(6): 469-471.

[10] Okamoto. Y, Ohkoshi. K, Itagaki. H, et al. Interlaboratory validation of The in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients[J]. Toxicology in Vitro, 1999, 13: 115-124.

[11] 廖南英, 伍海涛, 梁小雯, 等. 冰片与苯扎氯铵合用对红细胞及角膜上皮细胞的损伤效应[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 245-249.

[12] 陈鸿, 潘宁玲, 王国林. 等辐射分析法的原理及应用[J]. 国外医学(麻醉学与复苏分册), 2004, 25(5): 267-269.

[13] Luszczi JJ. Isobolographic analysis of interaction between drugs with nonparallel dose response relationship curves: a practical application. [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2007, 375: 105-114.

[14] 管崢, 毕姗姗, 杨璐, 等. 响应曲面模型在麻醉药合用中药物-药物相互作用研究的进展[J]. 药学报, 2008, 43(12): 1171-1178.

[15] 高原, 高鸿慈. 滴眼剂的开发和生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 351.

(编辑: 修春)

Visfatin 在 ApoE 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化发展中的作用及丹参酮 II A 干预研究

杨萍¹, 周玉平¹, 谢宪兵² (1. 南昌市中西医结合医院, 江西 南昌 330002; 2. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 探讨 visfatin 蛋白在动脉粥样硬化(AS)病变形成中的作用, 以及丹参酮 II A 抗载脂蛋白 E 基因缺陷(apoE-/-)小鼠 AS 病变的可能机制。**方法** 将 C57BL/6J 背景的 apoE-/- 小鼠随机分为 4 组: 模型组, 丹参酮 II A 高、低剂量组, 阳性对照组(辛伐他汀组), 每组 8 只。并以 8 只 C57BL/6J 小鼠作为空白对照组。apoE-/- 小鼠给予高脂饮食, 并按分组情况给予丹参酮 II A 磺酸钠(20, 10 mg·kg⁻¹)或辛伐他汀(5 mg·kg⁻¹)干预。第 14 周后全部处死, HE 染色观察动脉斑块形成程度, 测定斑块面积与管腔面积之比。酶法检测血清脂质含量。ELISA 方法检测血清高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、金属基质蛋白酶-9(MMP-9)含量。采用 western blotting 法检测主动脉壁 visfatin 表达。**结果** (1)空白对照组主动脉未见动脉粥样硬化改变, 模型组有较明显的主动脉内膜增厚及粥样斑块的形成。模型组血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平及 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 表达、动脉壁 visfatin 表达显著高于空白对照组, 而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平则显著低于空白对照组(均 P<0.05)。(2)与模型组比较, 丹参酮 II A 高、低剂量组、辛伐他汀组均可显著减少斑块面积与管腔面积比值, 降低血脂中 TC、TG、LDL-C 水平 (P<0.05), 升高 HDL-C 水平 (P<0.05); 明显降低血清细胞因子 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 水平, 降低小鼠主动脉壁 visfatin 表达。(3)在减少斑块面积、改善血脂水平、抑制炎症、抑制 visfatin 表达方面, 丹参酮 II A 均具有

收稿日期: 2014-05-23

作者简介: 杨萍, 女, 主治医师, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合防治心血管病研究。Email: jnuyangping@126.com.

基金项目: 江西省自然科学基金(20114BAB215048)。