

· 基础研究 ·

高压氧联合中药冰片对大鼠血脑屏障丙戊酸钠透过率的影响

李咪咪 刘芳 刘亦伟 张陈枝

【摘要】目的 观察高压氧(HBO)联合中药冰片对大鼠血脑屏障(BBB)丙戊酸钠透过率的影响。**方法** 选取 56 只健康 SD 大鼠,按照随机数字表法将其分为对照组(腹腔注射丙戊酸钠 0.1 g/kg)、HBO-1 组(HBO 治疗结束后 0.5 h 注射丙戊酸钠 0.1 g/kg)、HBO-2 组(HBO 治疗同时注射丙戊酸钠 0.1 g/kg)、HBO-3 组(HBO 治疗前 0.5 h 注射丙戊酸钠 0.1 g/kg)、低剂量冰片组(灌服 0.125 g/kg 冰片 0.5 h 后注射丙戊酸钠 0.1 g/kg)、高剂量冰片组(灌服 0.25 g/kg 冰片 0.5 h 后注射丙戊酸钠 0.1 g/kg)、联合应用组(灌服 0.125 g/kg 冰片 0.5 h 后注射丙戊酸钠 0.1 g/kg,0.5 h 后进行 HBO 治疗),每组 8 只。注射丙戊酸钠 1.5 h 后,取大鼠的血液及脑脊液,采用高效液相色谱法测定丙戊酸钠的浓度。**结果** 与对照组比较,HBO-2 组 (97.43 ± 12.09) mg/L、HBO-3 组 (100.10 ± 13.54) mg/L 大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),脑脊液血浆浓度比也明显增高($P < 0.05$);与对照组比较,高剂量冰片组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度 (91.09 ± 9.45) mg/L 及脑脊液血浆浓度比值 (0.577 ± 0.051) 较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与低剂量冰片组比较,HBO-3 组、联合应用组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 HBO-3 组比较,联合应用组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度 (112.43 ± 11.52) mg/L 及脑脊液血浆浓度比 (0.698 ± 0.058) 均显著增加($P < 0.05$)。各组间血液丙戊酸钠浓度比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HBO 疗法可提高大鼠 BBB 对丙戊酸钠的通透性,与低剂量冰片联用后效果更佳。

【关键词】 高压氧; 丙戊酸钠; 血脑屏障; 冰片

The combined effect of hyperbaric oxygen and borneol on the permeability of the blood-brain barrier to sodium valproate Li Mimi*, Liu Fang, Liu Yiwei, Zhang Chenzhi. *The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of hyperbaric oxygen (HBO) combined with borneol on the permeability of the blood-brain barrier to sodium valproate in rats. **Methods** Fifty-six male, healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group which received an intraperitoneal injection of sodium valproate (0.1 g/kg), an HBO-1 group to which HBO was administered 0.5 hours before an equivalent injection of sodium valproate, an HBO-2 group where the HBO and sodium valproate were administered together, an HBO-3 group which received HBO 0.5 hours after the injection, a low dosage borneol group (L-borneol) which received 0.125 g/kg of borneol by oral perfusion 0.5 hours before an injection of sodium valproate (0.1 g/kg), a high dosage borneol group which received 0.25 g/kg of borneol 0.5 hours before an injection of sodium valproate (0.1 g/kg) and a combined group which received the HBO-3 group's treatment supplemented with the borneol dose of the L-borneol group. There were 8 rats in each group. Blood and cerebrospinal fluid (CSF) were collected 1.5 h after the sodium valproate injection and the concentrations of sodium valproate were measured by high performance liquid chromatography. **Results** Compared with the control group, the CSF concentrations of sodium valproate in the HBO-2 and HBO-3 groups had increased significantly more (to 97.43 ± 12.09 mg/L and 100.10 ± 13.54 mg/L respectively). The ratios of the CSF to plasma (C/P) concentrations had also increased significantly more. The CSF concentration of sodium valproate in the H-borneol group (91.09 ± 9.45 mg/L) and the C/P ratio (0.577 ± 0.051) had increased significantly more than in the control group. Compared with the L-borneol group, there were significantly greater increases in the HBO-3 group and the combined group in the concentration of sodium valproate in the rats' CSF. Compared with the HBO-3 group, the average concentration of sodium valproate in the CSF of the combined group (112.43 ± 11.52 mg/L) and the C/P ratio (0.698 ± 0.058) had increased significantly more. There was no significant difference among the groups in the plasma concentrations of so-

dium valproate. **Conclusions** HBO can increase the permeability of the blood-brain barrier to sodium valproate, at least in rats. Combining HBO with a low dose of borneol has an additional effect.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Sodium valproate; Blood brain barrier; Borneol

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是存在于血液和脑组织之间的一种屏障系统,具有维持中枢神经系统内环境稳定、保护神经元的重要作用,但同时也是影响许多治疗性药物进入脑组织的主要障碍。目前促进 BBB 开放的相关手段有静滴甘露醇、放射治疗及服用冰片等,但这些治疗方案均存在不同程度的局限性^[1]。高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)作为一种无创性治疗方法,在临床上得到了广泛应用,但其对健康动物 BBB 丙戊酸钠透过率的研究尚较为少见。本研究通过测定不同 HBO 治疗时机及联合冰片应用后大鼠血液及脑脊液内丙戊酸钠浓度的变化,观察 HBO 及冰片对 BBB 丙戊酸钠透过率的影响,旨在为临床上提高药物脑组织浓度寻求新方法。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 56 只,体重(250±10)g,由福建医科大学实验动物中心提供。按照随机数字表法将大鼠分为对照组、HBO-1 组、HBO-2 组、HBO-3 组、低剂量冰片组、高剂量冰片组及联合应用组,每组 8 只。

二、主要试剂及仪器

丙戊酸钠购于赛诺菲制药有限公司,生产批号 120407,注射方案 0.1 g/kg,腹腔注射给药;冰片购于杭州胡庆余堂,生产批号 110709,化学成份为右旋龙脑,配置成 2% 液体石蜡溶液,灌服;Waters 高效液相色谱系统购于美国;YC2680/0.3-16 型空气加压舱产自烟台。

三、干预方法

对照组采用腹腔注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),HBO-1 组在 HBO 治疗结束后 0.5 h 注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),HBO-2 组在 HBO 治疗的同时注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),HBO-3 组在 HBO 治疗前 0.5 h 注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),低剂量冰片组灌服冰片(0.125 g/kg)0.5 h 后注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),高剂量冰片组灌服冰片(0.25 g/kg)0.5 h 后注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),联合应用组灌服冰片(0.125 g/kg)0.5 h 后注射丙戊酸钠(0.1 g/kg),0.5 h 后进行 HBO 治疗。

将各组大鼠置于自制的木箱内,木箱内径为 40 cm×45 cm×20 cm,两侧分别开有 1 个直径为 2 cm

的圆孔,靠近箱底部的孔为进气孔,与输氧管相连,靠近箱顶部的孔为出气孔,与排气管相连,为便于观察,箱顶采用玻璃推盖。实验采用烟台产 YC2680/0.3-16 型空气加压舱,将 HBO-1 组、HBO-2 组、HBO-3 组及联合应用组大鼠分别置于治疗舱内,经舱内一级供氧装置持续供给纯氧,约 10 min 后箱内氧浓度≥95%,持续供给纯氧至治疗结束。10 min 匀速将舱压加压至 0.25 MPa,稳压 60 min,25 min 匀速减压出舱。对照组、低剂量冰片组、高剂量冰片组大鼠在相同时间内处于常压空气环境下。

四、血液、脑脊液标本采集及含量测定

1. 标本采集:大鼠注射丙戊酸钠 1.5 h 后(HBO-3 组、联合应用组在氧舱中进行),用 10% 水合氯醛麻醉(1 ml/0.1 kg),经尾静脉采血 2 ml。通过触摸找到枕骨嵴,以其下方 3 mm 处的肌肉间隙为进针点,用手触摸有三角形凹陷,进针角度与大鼠身体平行,即针与头部的角度为 135°,针尖坡面向上、缓慢前进 0.5 cm 处即为小脑延髓池。进针过程中,当感觉到抵触感时,表明针尖已触及到黄韧带,针尖刺透黄韧带后会出现漏空感,此时针尖部位到达小脑延髓池,发现有透明无色液体进入针管后,立即停止进针,缓慢抽取 80~100 μl 脑脊液后,迅速退针^[2]。血液标本需离心 2 min,离心半径 13.5 cm,离心速度 4000 r/min,取离心后血液标本中的血清,与脑脊液标本一起保存于 -10℃ 的冰箱中,待测。

2. 丙戊酸钠含量测定:采用 Waters 高效液相色谱系统对各组大鼠的丙戊酸钠含量进行测定。采用 SunFire C18 色谱柱,内径 3.9 mm,长度 150 mm,甲醇与水的体积比为 78:22,流速 0.9 ml/min,检测波长 245 nm,进样量 20 μl,柱温 25℃。取 0.1 ml 生物样品,分别加入 250 μl 环己烷羧酸(0.1 g/L)和硫酸(1 mol/L),混匀后用 4 ml 正戊烷涡旋萃取 5 min 后离心 5 min,离心半径 13.5 cm,离心速度 4000 r/min,吸取上清液并加入三乙胺和 α-溴苯乙酮(10 mg/ml)各 20 μl,置 50℃ 水浴衍生化反应 10 min 后,用氮气流吹干,用 200 μl 甲醇溶解后,进样 20 μl 分析。

五、统计学分析

所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)形式表示,采用 SPSS 11.5 版统计学软件进行数据处理,数据比较采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)和独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、不同 HBO 治疗时机对大鼠丙戊酸钠浓度的影响

采用高效液相色谱系统测定 3 组大鼠不同 HBO 治疗时机下的丙戊酸钠浓度。与对照组比较, HBO-2 组、HBO-3 组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度明显升高 ($P < 0.05$)、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比显著增加 ($P < 0.05$)。HBO-1 组、HBO-2 组、HBO-3 组大鼠血液丙戊酸钠浓度之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 1。

表 1 不同 HBO 治疗时机对大鼠丙戊酸钠浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑脊液丙戊酸钠浓度 (mg/L)	血液丙戊酸钠浓度 (mg/L)	脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比
对照组	8	79.18 ± 6.34	156.3 ± 9.3	0.510 ± 0.035
HBO-1 组	8	86.06 ± 8.07	151.6 ± 8.0	0.568 ± 0.042
HBO-2 组	8	97.43 ± 12.09 ^a	163.4 ± 11.2	0.596 ± 0.056 ^a
HBO-3 组	8	100.10 ± 13.54 ^a	165.2 ± 10.3	0.606 ± 0.058 ^a

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$

二、不同剂量冰片对大鼠丙戊酸钠浓度的影响

与对照组比较, 高剂量冰片组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度明显升高 ($P < 0.05$)、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比显著增加 ($P < 0.05$)。低剂量冰片组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比虽较对照组高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与低剂量冰片组比较, 高剂量冰片组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比较高, 差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组、低剂量冰片组、高剂量冰片组大鼠血液丙戊酸钠浓度之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 2。

表 2 不同剂量冰片对大鼠丙戊酸钠浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑脊液丙戊酸钠浓度 (mg/L)	血液丙戊酸钠浓度 (mg/L)	脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比
对照组	8	79.18 ± 6.34	156.3 ± 9.3	0.510 ± 0.035
低剂量冰片组	8	84.79 ± 8.31	154.2 ± 8.0	0.549 ± 0.042
高剂量冰片组	8	91.09 ± 9.45 ^a	158.0 ± 11.2	0.577 ± 0.051 ^a

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$

三、HBO 联合冰片对大鼠丙戊酸钠浓度的影响

与对照组、低剂量冰片组比较, HBO-3 组、联合应用组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度明显升高 ($P < 0.05$)、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比显著增加 ($P < 0.05$)。与 HBO-3 组比较, 联合应用组大鼠脑脊液丙戊酸钠浓度明显升高 ($P < 0.05$)、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比显著增加 ($P < 0.05$)。对照组、低剂量冰片组、HBO-3 组、联合应用组大鼠血液丙戊酸钠浓度之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 3。

表 3 HBO 联合冰片对大鼠丙戊酸钠浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑脊液丙戊酸钠浓度 (mg/L)	血液丙戊酸钠浓度 (mg/L)	脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比
对照组	8	79.18 ± 6.34	156.3 ± 9.3	0.510 ± 0.035
低剂量冰片组	8	84.79 ± 8.31	154.2 ± 8.0	0.549 ± 0.042
HBO-3 组	8	100.10 ± 13.54 ^{ab}	165.2 ± 10.3	0.606 ± 0.058 ^{ab}
联合应用组	8	112.43 ± 11.52 ^{abc}	161.0 ± 10.3	0.698 ± 0.058 ^{abc}

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与低剂量冰片组比较, ^b $P < 0.05$; 与 HBO-3 组比较, ^c $P < 0.05$

讨 论

丙戊酸钠是一种广谱抗癫痫药物, 癫痫患者经过药物治疗, 血药浓度虽然达到有效治疗浓度范围, 但疗效不佳, 主要原因之一即 BBB 对丙戊酸钠的透过率较低, 导致患者脑组织中丙戊酸钠的浓度无法达到有效药物浓度^[3]。有研究报道, 大鼠经腹腔注射丙戊酸后 1~3 h, 其脑组织与血清中丙戊酸的浓度随时间延长呈现出下降趋势, 将癫痫大鼠与正常大鼠脑组织中丙戊酸的浓度进行比较后, 发现其药代动力学参数之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)^[4]。

HBO 可以增加血氧含量、提高血氧分压、增加组织储氧量、增强毛细血管内氧的弥散能力、降低血液粘度、改善微循环^[5]。有研究报道, 将大鼠分别暴露于高气压和 HBO 环境下, 发现大鼠 BBB 均有一定程度的开放, 与高气压组大鼠比较, HBO 组大鼠水通道蛋白 4 的表达水平上调、伊文思蓝含量显著升高, 表明 HBO 可以促进大鼠 BBB 进一步开放^[6]。水通道蛋白 4 主要分布于 BBB 两侧, 在介导水分子透过 BBB 过程中起到重要作用; 伊文思蓝是反映 BBB 通透性的常用指示剂之一, 可反映 BBB 的开放程度。Michalski 等^[7]也发现 HBO 治疗可使脑组织中伊文思蓝的含量显著增加。

本研究在 HBO 治疗的不同时间点应用丙戊酸钠, 发现在 HBO 治疗同时或治疗前 0.5 h 应用丙戊酸钠可提高其 BBB 透过率, 且对丙戊酸钠的血药浓度无明显影响。HBO-2、HBO-3 组大鼠脑脊液中丙戊酸钠浓度、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); HBO-1 组、HBO-2 组、HBO-3 组大鼠血液丙戊酸钠浓度之间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示丙戊酸钠注射后进行 HBO 治疗可有效提高脑组织药物浓度, 对治疗难治性癫痫有重要的临床意义。HBO-1 组在 HBO 治疗 0.5 h 后注射丙戊酸钠, 与对照组、HBO-2 组、HBO-3 组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明 HBO 治疗的安全性较好, 此结论与潘树义等^[8]的报道一致。

有较多研究均证实开窍类中药冰片可协助 BBB 开放, 提高大鼠脑脊液内丙戊酸钠的含量及脑脊液血

浆丙戊酸钠浓度比^[9]。大多数研究习惯于采用高剂量冰片进行 BBB 相关研究,而过量冰片对机体胃肠道有刺激作用,导致出现恶心、呕吐、腹痛等症状,并可见肝脾肿大、中枢神经兴奋,严重者可导致呼吸衰竭而死亡。胡利民等^[10]研究证实,高剂量冰片可诱导大鼠肝脏细胞色素 P450 含量增加。本研究将低剂量冰片组和高剂量冰片组大鼠进行对比,结果发现高剂量冰片组脑脊液丙戊酸钠浓度明显升高($P < 0.05$)、脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比显著增加($P < 0.05$);与低剂量冰片组比较,高剂量冰片组与其各项指标间的差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明单独应用低剂量冰片提高 BBB 通透率存在一定的局限性。

喻斌等^[11]研究报道,低剂量冰片可使脑部毛细血管的内皮间隙增大。本研究中,与低剂量冰片组比较,HBO-3 组脑脊液丙戊酸钠含量明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);联合应用组大鼠脑脊液丙戊酸钠含量及脑脊液血浆丙戊酸钠浓度比与 HBO-3 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 HBO 联合低剂量冰片可显著提高 BBB 对丙戊酸钠的透过率。

综上所述,HBO 可提高大鼠 BBB 对丙戊酸钠的通透性,与低剂量冰片联合应用后效果更佳,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 姜海洋,杨杨,付建平,等.选择性开放血脑屏障的相关方法研

- 究[J].医学综述,2010,16(11):1661-1663.
- [2] 任长虹,高明清,曹金强,等.大鼠脑脊液抽取的新方法[J].实验动物科学,2012,29(1):61-62.
- [3] 张峻,唐薇,季佳兴.抗癫痫药物中毒病例的血药浓度监测及分析[J].中国医院药学杂志,2003,23(3):157-158.
- [4] 龙小艳,章蓓,肖波.癫痫大鼠额叶、海马丙戊酸钠神经药代动力学的研究[J].中华内科杂志,2000,39(7):468-470.
- [5] 李红玲,房金勇,陈玉燕.高压氧及其在中枢神经疾病治疗方面的进展[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(10):788-790.
- [6] Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2005, 36(8):1679-1683.
- [7] Michalski D, Pelz J, Weise C, et al. Early outcome and blood-brain barrier integrity after co-administered thrombolysis and hyperbaric oxygenation in experimental stroke[J]. Exp Transl Stroke Med, 2011, 3(1):5.
- [8] 潘树义,潘晓雯,胡慧军,等.高压氧治疗与血脑屏障通透性的实验研究[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2006,13(4):216-218.
- [9] 吕旭潇,孙明江,孙凤志.冰片促进药物透过血脑屏障的研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(7):878-881.
- [10] 胡利民,姜民,王少峡,等.合成冰片对大鼠 CYP450 酶含量及 CYP3A1mRNA 表达的影响[J].天津中医药,2005,22(4):284-286.
- [11] 喻斌,吕高红,孙永,等.电针配合冰片对小鼠血脑屏障通透性的影响[J].针刺研究,2011,36(5):335-340.

(修回日期:2014-08-27)

(本文编辑:凌 琛)

· 外刊摘英 ·

Physical activity and incident disability among adults at risk for knee arthritis

BACKGROUND AND OBJECTIVE Disability accounts for more than one in four dollars spent on health care. This study examined whether moderate physical activity is related to a decreased risk of developing disability among community dwelling adults with knee osteoarthritis (OA).

METHODS This prospective, multi-site cohort study included community dwelling adults participating in the Osteoarthritis Initiative (OAI). Subjects were 45 to 79 years of age, and were eligible for study inclusion if they had OA, with symptoms in at least one knee, or at least one established risk factor for knee OA. Physical activity was determined using an accelerometer. Disability was assessed, based upon limitations in instrumental and basic activities of daily living at baseline and at two years. The secondary outcome was progression of disability.

RESULTS Of the 1 680 adults studied, 149 cases of new disability were identified. Significantly lower frequencies of incident disability were related to greater light activity time among men ($P = 0.042$) and women ($P < 0.001$), adults with knee OA ($P < 0.001$) and those without knee OA ($P = 0.001$). A multivariate analysis revealed that greater activity was significantly related to lower risk of developing disability. In addition a strong association was found between increasing quartile categories of moderate to vigorous activity time and reduced incident disability ($P = 0.005$). The hazard ratios for disability progression decreased across increasing quartile categories of light activity, as well as moderate to vigorous activity ($P = 0.018$ and $P = 0.07$, respectively).

CONCLUSION This study of community dwelling adults with or at high risk of osteoarthritis of the knee found an inverse relationship between physical activity and the risk of developing disability.

【摘自:Dunlop DD, Song J, Semanik PA, et al. Relation of physical activity time to incident disability in community dwelling adults with or at risk of knee arthritis: prospective cohort study. BMJ, 2014, 348: g2472.】