

冰片对氟尿嘧啶经皮促透作用的多尺度研究

王冉 史新元 杨树芳 戴幸星 乔延江

【摘要】 目的 研究冰片对氟尿嘧啶的经皮促透作用,探究冰片对亲水性药物的促透机理。**方法** 采用体外透皮实验、透射电子显微镜和介观分子动力学模拟等方法,分别对氟尿嘧啶的自身渗透性和冰片对其的促透作用进行多尺度研究。**结果** 氟尿嘧啶难以穿透角质层,最大渗透速率($0.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)和单位面积累计渗透量($20.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)均较低,在冰片的促透作用下,氟尿嘧啶的渗透速率和渗透量均增大,当冰片浓度为 1% 时,氟尿嘧啶的渗透速率 $[13.58 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$ 和 24 小时单位面积累计渗透量($325.50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)较高,促渗比达 16.57 倍,且对角质层结构影响不大,为冰片促透氟尿嘧啶的最佳浓度;冰片的促透作用主要表现为疏松角质层中脂质的排列,促进其中水通道的形成,从而促进氟尿嘧啶透过。**结论** 冰片可以促进亲水性氟尿嘧啶经皮渗透,其主要促透机理为疏松角质层脂质排列,促进水通道的形成。

【关键词】 冰片; 氟尿嘧啶; 促透作用; 分子动力学模拟; 多尺度方法

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.05.002

Multi-scale study of borneol on the transdermal effect of fluorouracil WANG ran, SHI Xinyuan, YANG Shufang, et al. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: QIAO Yanjiang, E-mail: yjqiao@263.net

【Abstract】 Objective To investigate the penetration enhancement mechanism of borneol on fluorouracil, and to explore the permeation mechanism of borneol on hydrophilic drugs. **Methods** The in vitro permeation experiments, transmission electron microscopic and microscopic molecular dynamics model was used to study the penetration of fluorouracil and the permeation enhancement of borneol. **Results** Fluorouracil was difficult to penetrate the stratum corneum, the maximum penetration rate was $0.82 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, and cumulative osmolality after 24h ($20.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was low; with the enhancement effect of borneol, both penetration rate and cumulative osmolality of fluorouracil was increased, when the concentration of borneol was 1%, penetration rate $[13.58 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$ and cumulative osmolality after 24h ($325.50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) were the maximum value, the enhancement ratio was 16.57, and it had little effect on the stratum corneum structure, so 1% was the optimum concentration; Borneol can make the membrane lipid become loose and can promote the formation of water channels, thereby promoting the hydrophilic drugs penetration across. **Conclusion** Borneol can effectively promote the permeation of hydrophilic fluorouracil, the mechanism may be loosening the stratum corneum lipids and promoting the formation of water channels.

【Key words】 Borneol; Fluorouracil; Penetration enhancement; Molecular dynamics simulations; Multi-scale method

基金项目: 国家自然科学基金(81473364);北京市自然科学基金(7162122)

作者单位: 100069 北京,首都医科大学中医药学院[王冉(硕士研究生)];北京中医药大学中药信息工程研究中心(杨树芳、戴幸星、史新元、乔延江)

作者简介: 王冉(1992-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:中药化学。E-mail:wangran2017@sina.com

通信作者: 乔延江(1956-),博士,教授。研究方向:中药信息学。E-mail:yjqiao@263.net

经皮给药系统(transdermal drug delivery system, TDDS)现已成为药剂学的研究热点之一,但由于皮肤角质层致密的“砖墙”结构,使其成为阻碍药物经皮吸收的重要屏障。研究表明,经皮促透剂的加入可有效提高药物的透皮量^[1]。中药冰片是樟科植物樟 *Cinnamomum camphora* (L.) presl 的新鲜枝叶经提取加工而得,具有开窍醒神、清热止痛的功效,是一种常用的中药挥发油类经皮促透剂,促透效果良好^[2-3],且对皮肤刺激性、毒性较小^[4]。文献报道,冰片对不同种类、不同性质的药物均具有良好的促透效果^[5],但关于冰片对各类药物促透机制的研究较少。前人多运用定量构效关系(quantitative structure-property relationship, QSPR)将不同药物渗透性与其结构性质相关联,结果表明药物的疏水性和相对分子质量与其渗透性关系紧密^[6]。本文以常用于治疗皮肤病的亲水性药物氟尿嘧啶为被促透药物^[7-8],采用体外渗透实验、透射电子显微镜和介观分子动力学模拟等方法,分别从宏观和介观层面探究冰片对难以经皮渗透的亲水性药物的促透机理,以期含冰片制剂的开发提供依据,为经皮渗透作用的研究提供新方法。

1 材料与方法

1.1 经典透皮实验部分

1.1.1 实验动物 SD 大鼠,清洁级,24 只,5~6 周龄,雄性,体重(200±10) g,购于斯贝福实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2016-0002。本文实验全程中,动物处置方法确保符合动物伦理学要求。

1.1.2 药物与主要试剂 冰片(纯度 98%,批号:111688-200501,中国食品药品检定研究院);氟尿嘧啶(纯度 98%,批号:100187-201203,中国食品药品检定研究院);无水乙醇(分析纯,批号:20150504,北京化工厂);1,2-丙二醇(分析纯,批号:20120213,北京化工厂);甲醇[分析纯,批号:148671,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];氯化钠(分析纯,批号:20071211,北京化工厂);PBS 缓冲液(pH=7.2~7.4,批号:20150827,北京索莱宝科技有限公司);戊二醛固定液(2.5%,批号:20141219, Biotopped Life Sciences);蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.1.3 仪器 智能透皮扩散仪(TP-6,天津市新天光分析仪器技术有限公司);高效液相色谱仪

(1100, Agilent, USA);分析天平(BP211D, Sartorius, GER)。

1.1.4 方法 (1)皮肤样品的制备:大鼠乙醚麻醉后脱颈处死,剃去腹部毛发,剪取腹部正中部位皮肤,拭去皮下组织,备用。(2)体外透皮实验:采用改良的 Franz 扩散池装置。将皮肤固定于供给室和接收室之间,有效接触面积为 1.23 cm²。供给室分别加入各组供试液,给药体积为 2 mL;接收室加入 PBS 缓冲液,溶剂体积为 15 mL。设定磁力搅拌速度为 300 r/min,水浴温度为 34℃。实验开始时刻为 0 时刻,在第 1、2、4、6、9、12、22 小时分别取样 2 mL,并向接收室补充等体积的 PBS 缓冲液。将取出的样品过 0.45 μm 滤膜,4℃冰箱保存待测。透皮实验后的皮肤浸于 2.5% 戊二醛固定液中,于 4℃冰箱保存,待用于透射电子显微镜观察。(3)氟尿嘧啶色谱条件:采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),选用 Waters×bridge C₁₈(250×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;柱温 30℃;流动相为甲醇-水(5-95);检测波长 266 nm;流速 1 mL/min;进样量 20 μL。

1.2 透射电子显微镜部分

1.2.1 仪器 超薄切片机(EMUC7, Leica, GER);透射电子显微镜[JEM-1230(HC), JEOL, JAP]。

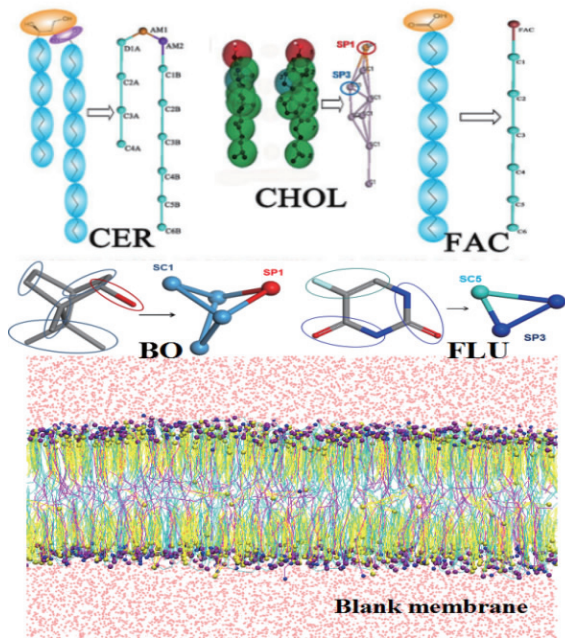
1.2.2 方法 将透皮实验后的皮肤样品在 1% OsO₄ 中固定,并在梯度浓度的丙酮中脱水。将脱水后的样品嵌入低黏度的环氧树脂混合物中,切片。超薄切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,用透射电镜观察。

1.3 计算机模拟部分

本文所有模拟工作均基于 Gromacs 4.6.3 分子模拟程序展开,采用粗粒化的介观模拟方法,选用适用于脂质、聚合物、糖类及糖脂类化合物的 Martini 力场。

1.3.1 模拟体系粗粒化模型搭建 研究表明,角质层脂质分子主要由神经酰胺(ceramides, CER)、胆固醇(cholesterol, CHOL)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)组成,配比约为 2:2:1^[9-10]。课题组已对此模型的结构性质进行考察,结果表明,此模型具有真实角质层的屏障作用及稳定的结构,适用于对生物膜的模拟研究^[11]。神经酰胺 2、胆固醇、C24 游离脂肪酸、冰片、氟尿嘧啶分子结构可从 Pubmed 数据库检索下载,并根据 Martini 力场粗粒化规则对没有粗粒化力场参数的分子进行粗粒化及力场参数

的赋予。各分子结构及粗粒化模型和角质层脂质模型详见图 1。



注:BO:冰片;FLU:氟尿嘧啶;blank membrane:空白脂质膜

图 1 3 种脂质分子及其粗粒化模型

1.3.2 模拟参数设置 具体模拟参数如表 1 所示。

表 1 介观模拟参数设置

参数类型	参数	设置
控制参数	时间步长 dt (fs)	20
	阶段方案	group
邻居搜索	更新频率 (steps)	10
	截断半径 (nm)	1.4
库仑力	种类	grid
	类型	shift
范德华力	阈值 (nm)	1.2
	种类	shift
温度耦合	方法	v-rescale
	耦合组	system
压力耦合	方法	berendsen
	类型	semiisotropic
键限制	压缩系数	3e-4
	参考值 (bar)	1
	限制	none
	算法类型	LINCS

2 结果

2.1 体外透皮研究

氟尿嘧啶的临床用量为 0.1% ~ 0.5% ,预实验

结果表明,浓度为 0.2% 时氟尿嘧啶自身渗透性最好,因此将其浓度设置为 0.2% ,冰片浓度分别设置为 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、1.0%、2.0% 和 3.0% ,进行冰片对氟尿嘧啶促透的体外透皮实验。计算各浓度冰片作用下,氟尿嘧啶的单位面积累计渗透曲线(Qn-t)、渗透速率 J[$\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$]、24 小时累计单位面积累计渗透量 Q24 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 和促渗比。结果如表 2 所示。

由表 2 可知,未加入冰片时,氟尿嘧啶的渗透速率和 24 小时累计渗透量较低,渗透能力无法达到治疗需求^[12]。加入冰片后,氟尿嘧啶的累计渗透量和渗透速率均有明显上升。随冰片浓度增大,累计渗透量、渗透速率和促渗比均增大,当冰片浓度达到 3.0% 时,促渗比约为 18 倍;当冰片浓度低于 0.5% 时,促渗比增速较快;冰片浓度达到 1.0% 后,促渗比增速较缓,接近饱和。为了阐释冰片的促透机理,还需进行透射电镜实验及介观模拟。

2.2 透射电镜研究

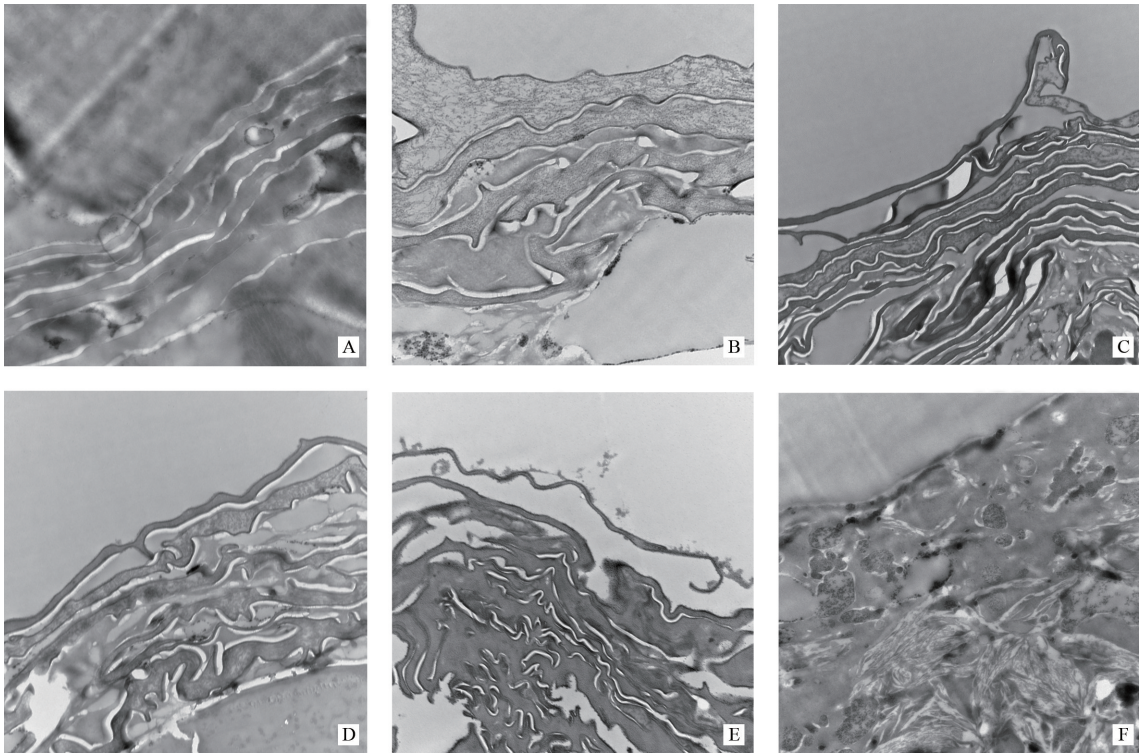
将体外透皮实验后的各组皮肤进行透射电子显微镜观察,结果如图 2 所示。比较不同浓度冰片作用后的角质层结构可知,未加入冰片时,角质层排列整齐;加入冰片后,角质层出现明显的波动。冰片浓度低于 0.5% 时,随冰片浓度上升,角质层紊乱度增强,波动明显,表明角质层流动性较强,易于渗透,此时冰片对氟尿嘧啶的促渗比增速较大;当冰片浓度达到 1.0% 后,角质层出现断层、层间交错等现象,脂质膜内部剧烈运动,利于药物渗透;当冰片浓度达 2.0% 后,角质层整体变薄,出现皱缩、剥离等现象,层状结构彻底被破坏,甚至出现溶解状态,不利于药物的进一步渗入,冰片对氟尿嘧啶的促透作用趋于饱和状态。

2.3 介观分子动力学模拟

2.3.1 氟尿嘧啶 自身渗透性考察介观分子动力学模拟可进行分子水平机理的阐释,揭示宏观体系动态变化规律,但由于计算机模拟研究与真实体系中的反应存在一定差异,模拟体系与实验中的药物浓度并不能达到数值上的完全对应。在模拟研究中,将氟尿嘧啶浓度分别设置为 1.0%、3.0%、5.0%、7.0%、10.0%、15.0% 和 20.0% ,考察其在角质层的扩散情况。以药物浓度为 3.0% 的体系为例,药物在体系中的分布及体系中各成分在 z 方向的密度分布图如图 3 所示。

表 2 氟尿嘧啶渗透参数

CBO(%)	线性回归方程	R^2	$J[\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$	$Q_{24}(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$	ER
0.0	$Y=0.81979X+0.77877$	0.98284	0.81979	20.45	1.00
0.1	$Y=5.4833X+2.4688$	0.99366	5.4833	134.07	6.69
0.2	$Y=6.3957X+6.864$	0.99078	6.3957	160.36	7.80
0.3	$Y=7.2311X+9.2141$	0.98787	7.2311	182.76	8.82
0.4	$Y=10.853X-4.3011$	0.98986	10.853	256.17	13.24
0.5	$Y=12.507X-0.73534$	0.98878	12.507	299.43	15.26
1.0	$Y=13.584X-0.51466$	0.98346	13.584	325.50	16.57
2.0	$Y=14.19X+1.55$	0.98577	14.19	342.11	17.31
3.0	$Y=14.885X+6.663$	0.98629	14.885	363.18	18.16



注:A 冰片浓度 0.0%; B 冰片浓度 0.2%; C 冰片浓度 0.5%; D 冰片浓度 1.0%; E 冰片浓度 2.0%; F 冰片浓度 3.0%

图 2 透皮实验后透射电子显微镜观察结果(×20000)

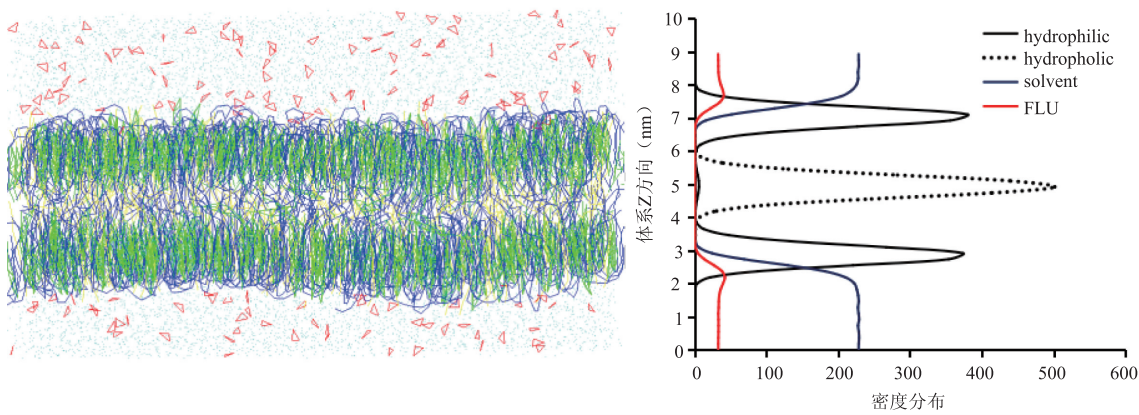


图 3 氟尿嘧啶与角质层相互作用的模拟图及脂质头基、脂质尾链、氟尿嘧啶密度分布图

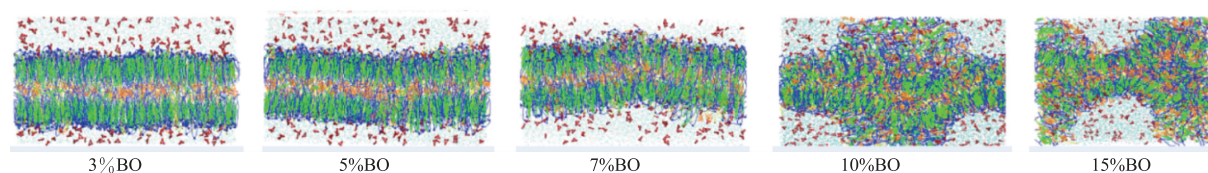


图 4 冰片对氟尿嘧啶促透作用模拟 400 ns 后体系快照

2.3.2 冰片对氟尿嘧啶促透作用 研究设置氟尿嘧啶浓度为 3%, 冰片浓度分别为 3%、5%、7%、10% 和 15%, 考察冰片对氟尿嘧啶透过的影响。当冰片浓度低于 7% 时, 冰片分子全部进入膜内, 并大量聚集在脂质的疏水尾链区; 氟尿嘧啶分子部分进入膜内, 多数分布在脂质头基部位, 随冰片浓度增大, 膜的波动更明显, 冰片浓度达到 7% 时, 脂质膜波动剧烈、出现弯曲。当冰片浓度达到 10% 后, 膜的双分子层结构被破坏, 大量脂质在膜内堆积, 氟尿嘧啶进入膜内的数量增多, 且由头基部位转移至膜内部。观察药物与脂质膜的相互作用过程发现, 当模拟开始时, 冰片迅速进入膜内, 分别与脂质头基和脂质疏水链相互作用, 并牵引部分脂质进入膜内。处于膜内的脂质大量堆积、再排列, 疏水链伸向膜体系的疏水区域, 与其他脂质尾链交叉排列, 脂质头基由于彼此间的氢键作用形成亲水表面, 即水通道, 供亲水性成分通过脂质膜。水通道的形成与冰片对亲水性药物透膜关系紧密, 因此本文对各体系中, 水通道的形成时间和持续时间进行记录, 以解释各浓度冰片的促透作用。结果见图 4~5。

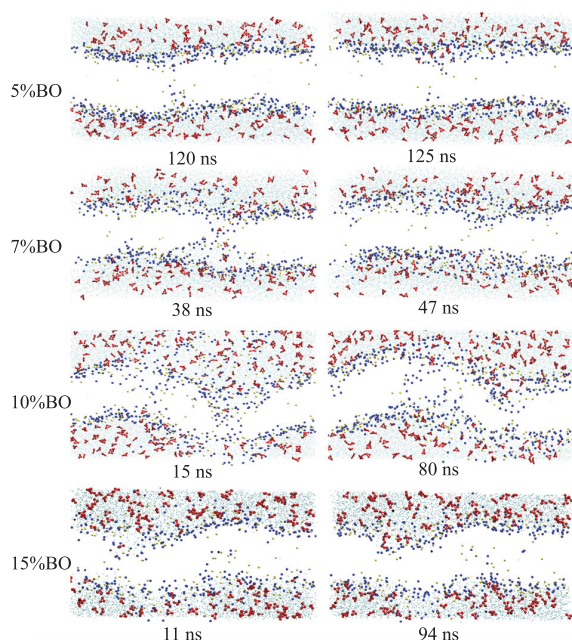


图 5 冰片促透氟尿嘧啶模拟体系中水通道的形成始末时间

实验证明, 当加入的冰片浓度达到 5% 后, 膜体系开始出现瞬时水通道, 且随冰片浓度增大, 水通道出现的时间越早, 持续时间越长。即使在高浓度冰片 (10% 及以上) 作用下, 脂质膜的结构被破坏之前, 依然会产生瞬时水通道, 促进氟尿嘧啶透膜。

为了量化冰片对角质层脂质膜结构的影响, 本文采用脂质膜的单个脂质头基面积、厚度、脂质神经酰胺和游离脂肪酸分子的有序度参数对脂质膜结构进行了定量分析, 结果见图 6。由图可知, 当冰片浓度小于 7% 时, 随冰片浓度增大, 膜脂质排列趋于疏松, 脂质间隙变大, 单个脂质头基面积增大; 脂质活动区域增大, 活动增强, 出现弯曲等现象, 导致脂质的有序度减小, 膜厚度减小。当冰片浓度增大至 7% 后, 大量脂质进入膜内形成逆胶束结构, 膜结构被破坏, 使膜整体表面积减小而 APL 减小, 厚度增大, 脂质有序度参数降低。

3 结论

本文采用计算机模拟与经典实验相结合的方法, 从不同尺度阐释了冰片对亲水性药物氟尿嘧啶的促透机理。

3.1 氟尿嘧啶自身渗透能力

在透皮实验中氟尿嘧啶的渗透量、渗透速率均较低, 并且在模拟实验中氟尿嘧啶分子多分布在溶剂中, 少量聚集在脂质头基区域, 不存在明显的透膜现象, 因此证明其自身渗透能力较弱。

3.2 冰片对氟尿嘧啶的促透作用

在冰片的促透作用下, 氟尿嘧啶的渗透能力显著增强。结合透皮实验和模拟实验结果可知, 当冰片浓度低于 1% 时 (模拟中为低于 7%), 膜单个脂质头基面积增大, 厚度减小, 脂质有序度降低, 即膜脂质排列疏松, 灵活度增强, 一方面使膜流动性增强, 有利于药物从脂质间渗透, 另一方面, 有助于瞬时水通道的形成, 从而促进氟尿嘧啶通过膜脂质间和水通道进入膜内。当冰片浓度进一步上升, 膜结构被破坏, 此时膜单个脂质头基面积降低, 厚度增大, 阻碍药物渗透, 但由于膜被彻底破坏前依旧有水通道形成, 因此渗透速率增大, 但促透效果趋于

饱和。当冰片浓度为 1% 时,冰片对氟尿嘧啶的促渗比达 16.57 倍,并且对角质层的结构影响不大,是冰片促透氟尿嘧啶的最佳浓度。

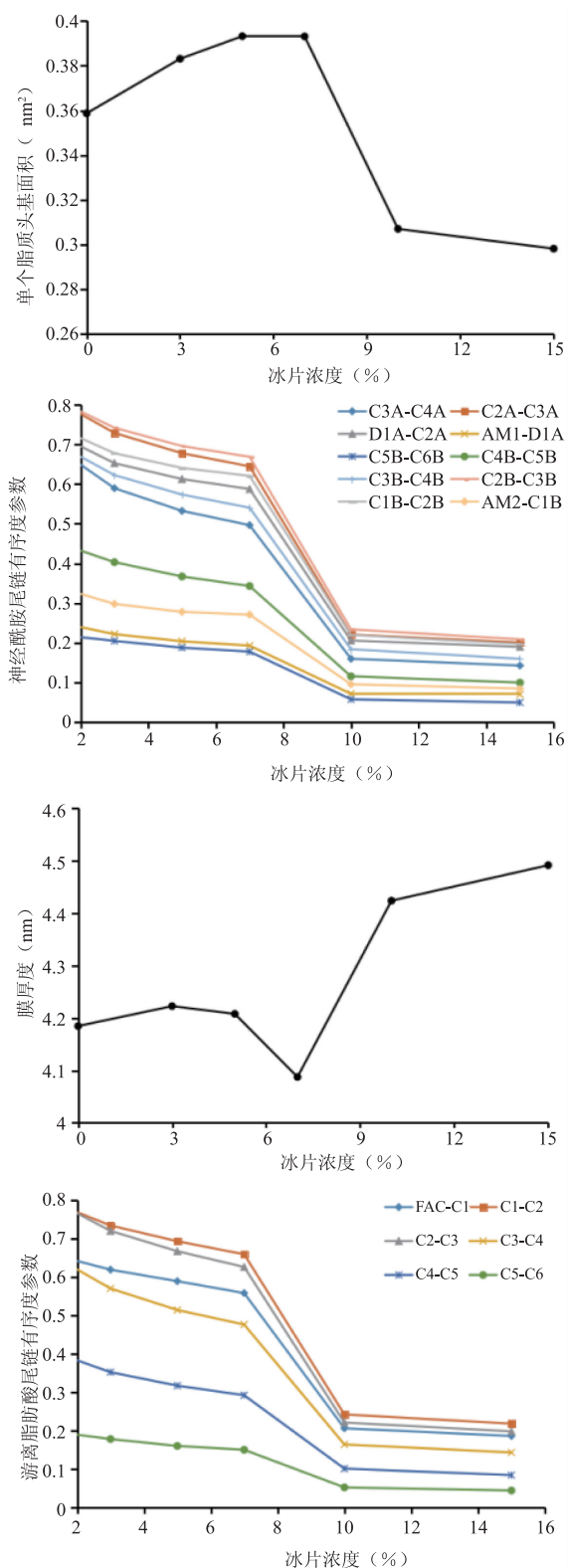


图6 冰片促透氟尿嘧啶模拟体系脂质膜的结构参数

具有促透作用的中药挥发油类成分有很多,如薄荷醇、桉油精、柠檬烯等^[13-14],但其促透机理尚未明晰,因此对挥发油类促透剂促透机理及规律的研究还需开展大量工作,尤其是对可用于促透亲水性药物的促透剂进行研究,将为经皮给药制剂开发过程中挥发油类促透剂的科学应用提供依据。

此外,本文所建立的计算机模拟与经典实验相结合的方法,从不同尺度考察了促透剂对被促透药物及脂质膜的影响,所得结果相互佐证、互相补充,更加深入、全面地阐释了促透剂的促透机理。该方法不仅可应用于促透机理研究,还为经皮给药制剂的开发提供新方法。

参考文献

- [1] 张宏梅,崔佰吉,钱曦垚,等. 苯磺酸氨氯地平乳剂凝胶的制备及其体外透皮吸收的考察[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(3): 348-360.
- [2] 许卫铭,王晖,李昕,等. 蛇床子挥发油、薄荷醇及冰片对甲硝唑促透作用的比较[J]. 中南药学, 2006, 4(2): 111-113.
- [3] 朱健平,王宗锐. 龙脑促进药物经皮渗透作用的研究[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(2): 104-106.
- [4] Huang L, Bai J, Yang H, et al. Combined use of borneol with labrasol promotes penetration of baicalin through rabbit cornea in vitro[J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28(1): 1-7.
- [5] Yi QF, Yan J, Tang SY, et al. Effect of borneol on the transdermal permeation of drugs with differing lipophilicity and molecular organization of stratum corneum lipids[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2016, 42(7): 1086.
- [6] 陈晓瑾,胡功允,梁文权. 四种药物的经皮渗透性能预测[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(1): 52-57.
- [7] 解荣桂. 异维A酸联合0.5%氟尿嘧啶软膏治疗顽固性扁平疣临床观察[J]. 中国美容医学, 2013, 22(6): 685.
- [8] 张海军. 氟尿嘧啶在皮肤科的几种新用途[J]. 医药导报, 1994, 15(3): 115.
- [9] Norlen L. Skin barrier structure and function: the single gel phase model[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(4): 830-836.
- [10] Das C, Olmsted PD, Noro MG. Water permeation through stratum corneum lipid bilayers from atomistic simulations[J]. Soft Matter, 2009, 5(22): 4549-4555.
- [11] 杨树芳,尹倩倩,史新元,等. 基于计算机模拟的经皮给药研究中角质层脂质模型搭建及其稳定性考察[J]. 计算机与应用化学, 2016, 33(7): 788-792.
- [12] 邹浪,李晓芳,邓红,等. 氟尿嘧啶的理化性质及透皮促渗剂对氟尿嘧啶经皮渗透的研究[J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(6): 63-66.
- [13] 王景雁,兰颐,林红梅,等. 薄荷醇对不同logP值中药有效成分经皮吸收的促透研究[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(2): 202-209.
- [14] 赵茜,李伟泽,程玉钊,等. 几种挥发油对黄藤素透皮给药的促透作用研究[J]. 应用化工, 2016, 45(1): 186-189.

(收稿日期: 2017-01-18)

(本文编辑: 韩虹娟)