

合成冰片对地塞米松角膜渗透性的影响

杨洪滨^{1*}, 姜洁^{1*}, 张小宇², 寻延滨³, 崔浩¹, 郭婧¹

基金项目:黑龙江省卫生厅科研项目(No. 2013014);黑龙江省博士后科研启动金资助项目(No. LBH-Q13116)

作者单位:¹(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科;²(150000)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第二医院神经外科;³(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江省药品检验所

注:*杨洪滨和姜洁对本文贡献一致。

作者简介:杨洪滨,博士,副主任医师,副教授,研究方向:眼科学,神经眼科学;姜洁,学士,主管护师,研究方向:眼科学。

通讯作者:张小宇,博士,副主任医师,副教授,研究方向:神经眼科学及药理学. frankhmua@gmail.com

收稿日期:2016-10-25 修回日期:2017-03-13

Effect of synthetic borneol on transcorneal permeability of dexamethasone

Hong-Bin Yang^{1*}, Jie Jiang^{1*}, Xiao-Yu Zhang², Yan-Bin Xun³, Hao Cui¹, Qiang Guo¹

Foundation items: Science and Technology Project of Health Department of Heilongjiang Province (No. 2013014); the Ph. D. Programs Foundation of Heilongjiang Province (No. LBH-Q13116)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;²Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China;³Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

* **Co-first author:** Hong-Bin Yang and Jie Jiang.

Correspondence to: Xiao - Yu Zhang. Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. frankhmua@gmail.com

Received:2016-10-25 Accepted:2017-03-13

Abstract

• **AIM:** To study the effect of synthetic borneol on transcorneal permeability of dexamethasone. The ocular irritation was also evaluated.

• **METHODS:** The freshly excised corneas, whole corneas or de-epithelialized corneas, were immediately mounted in perfusion cells. Dexamethasone containing free-borneol or borneol was added into the deliver chamber respectively in each group. At different time point after addition of solution, 50μL of the receptor solution was removed. The concentration of dexamethasone was determined and the apparent

permeability coefficient (Papp) was calculated. Hydration level of cornea was measured and irritation test was observed.

• **RESULTS:** The Papp for dexamethasone in whole cornea increased by 2.40 fold in borneol group ($P < 0.05$). The Papp for dexamethasone in de-epithelialized cornea did not increase apparently ($P > 0.05$). Synthetic borneol did not increase hydration level and irritation of cornea ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** Synthetic borneol can improve the corneal permeation of lipophilic drug dexamethasone and do not damage corneal tissue.

• **KEYWORDS:** synthetic borneol; dexamethasone; permeability enhancer; cornea

Citation: Yang HB, Jiang J, Zhang XY, et al. Effect of synthetic borneol on transcorneal permeability of dexamethasone. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(4):628-630

摘要

目的:研究合成冰片对地塞米松的角膜通透作用的影响,并评估其眼部刺激性。

方法:采用完整及去上皮离体角膜进行兔体外扩散实验,供给池中分别加入不含冰片和含合成冰片的地塞米松滴眼液,用高效液相色谱仪测定接受池中不同时间点样品中地塞米松的含量,计算表观渗透系数。测定完整角膜的角膜水化值。观察合成冰片点眼对角膜的刺激性。

结果:与对照组相比,合成冰片使地塞米松在完整角膜的表观渗透系数增加2.40倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),合成冰片不能显著增加地塞米松在去上皮角膜的表观渗透系数,差异无统计学意义($P > 0.05$)。角膜水化值及刺激性试验表明,合成冰片不会明显增加角膜水化值及白兔眨眼次数,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

结论:合成冰片能够提高脂溶性药物地塞米松的角膜通透性,无明显角膜刺激性。

关键词:合成冰片;地塞米松;渗透促进剂;角膜

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.09

引用:杨洪滨,姜洁,张小宇,等.合成冰片对地塞米松角膜渗透性的影响.国际眼科杂志2017;17(4):628-630

0 引言

眼局部用药是治疗眼科疾病的重要给药方式。由于眼部屏障尤其是角膜屏障的阻挡,局部用药后药物很难在眼内达到有效治疗浓度。国内外学者不断优化眼科药物传递系统,促进药物眼内吸收,提高药物的生物利用度^[1-2]。其中,渗透促进剂能有效地改善药物的眼内通透性,具有广泛的应用前景。近年来的研究表明,冰片是

一种佐使药,能够促使与其配伍的药物通过各种生理屏障作用于相应的靶组织,如血脑屏障、皮肤、胃黏膜、小肠黏膜、鼻黏膜和口腔黏膜^[3-5]等。有研究报道,冰片可提高葛根素滴眼液在兔离体角膜的通透性,提示冰片可能是一种潜在有效的角膜渗透促进剂^[6]。冰片是一种小分子双环单萜类中药,分为天然冰片和合成冰片两类,具有开窍醒神,清热止痛,去翳明目^[7]的功效。本实验目的是以地塞米松为模型药物考察合成冰片对角膜屏障的影响,并且评估其对角膜的刺激性。

1 材料和方法

1.1 材料 合成冰片,购于广州化工厂。地塞米松,购于天津天药药业股份有限公司。地塞米松标准品(批号0129-9702),购于中国药品生物制品检定所。实验用水为重蒸水,其它试剂均为色谱纯或分析纯。实验动物:新西兰白兔24只(哈尔滨医科大学实验动物中心),雌雄兼用,体质量2.5~3.0kg,被分别饲养在笼中。环境温度控制在(25±1)℃,相对湿度50%±5%,饮食及饮水不受限制。实验前经裂隙灯检查无眼疾者纳入实验。实验经哈尔滨医科大学动物实验伦理委员会批准。扩散介质:谷胱甘肽-碳酸氢钠林格溶液(GBR),由两部分组成:溶液A:NaCl 12.4g/L, KCl 0.716g/L, NaH₂PO₄ 0.206g/L, NaHCO₃ 4.908g/L;溶液B:CaCl₂ 0.23g/L, MgCl₂ 0.318g/L, 葡萄糖 1.8g/L, 氧化型谷胱甘肽 0.184g/L。上述两溶液低温储存,用前等量混合。此溶液可保存角膜6h^[8]。

1.2 方法

1.2.1 体外角膜渗透性实验 耳缘静脉注射20mL空气处死白兔16只,距角膜边缘2mm的巩膜处做环切。除去晶状体、玻璃体等眼部组织,用眼科镊子轻轻剥离虹膜/睫状体,得到带有2mm巩膜环的角膜,用GBR溶液淋洗3次备用。去上皮角膜取材时将角膜上皮层刮掉。处死动物后20min内开始体外扩散实验。将新鲜离体角膜小心固定在Franz扩散池的供给池和接受池之间,角膜的内皮层面向接受池。将提前预热的(35℃)谷胱甘肽-碳酸氢钠林格液(GBR)加入到供给池和接受池中。在系统平衡15min后,撤掉供给池GBR液,分别换成不含合成冰片的地塞米松滴眼液、含合成冰片的0.1%地塞米松滴眼液1mL及GBR液2mL。装置置于恒温磁力搅拌器中,星形搅拌子搅拌,恒温水浴控制温度在35℃±1℃,同时供给池和接受池用盖子旋紧,防止蒸发。为了延长角膜保存时间在角膜两侧以约每秒钟2~3个气泡的速度通入O₂和CO₂(95%:5%)的混合气体。试验开始后,分别在15、30、45、60、90、120、150、180、210和240min从接受池中取样50μL,同时补充等体积的GBR溶液。每组完整角膜与去上皮角膜各4只,样品置于-20℃冰箱中,待测定。

1.2.2 样品测定与分析 地塞米松采用反向高效液相色谱法(RP-HPLC)检测。色谱条件:色谱柱为Thermo BDS C₁₈(250mm×4.6mm,5μm),预柱为C₁₈保护柱(4mm×3mm,5μm);以乙腈-水(4:6)为流动相;检测波长为240nm。理论板数按地塞米松峰计算应不低于3000。

1.2.3 数据分析 表观渗透系数 P_{app} (cm/s)按照如下方程计算^[9] $P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot C_0 \cdot A \cdot 60}$,其中 C_0 为供给池初始药物浓度;A为有效透过面积; $\Delta Q/\Delta t$ 可由接受池累积透

表1 冰片对地塞米松在完整角膜及去上皮角膜渗透系数的影响

组别	$(n=4, \bar{x} \pm s, 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$	
	完整角膜	去上皮角膜
对照组	11.99±3.74	92.23±16.03 ^c
冰片组	28.77±9.45 ^a	100.67±20.22

^a $P < 0.05$ vs 完整角膜对照组; ^c $P < 0.05$ vs 完整角膜对照组。

过量(Q)-时间(t)曲线稳态部分的斜率求得;60代表由分钟到秒的转换。

1.2.4 角膜水化值 完整角膜检测角膜水化值,仔细去除巩膜组织,将新鲜角膜及体外实验暴露于扩散介质的角膜区域称重,记为 W_b ,70℃干燥12h后再次称重,记为 W_a ,角膜水化值按下式计算: $HL\% = \frac{W_b - W_a}{W_b} \times 100$ 。

1.2.5 眼部刺激性试验 另取8只白兔随机分为冰片组及对照组,冰片组白兔结膜囊内滴入30μL含有冰片的磷酸缓冲溶液,对照组白兔结膜囊内滴入空白磷酸缓冲溶液30μL,强制眨眼一次,使溶液在角膜表面均匀分布,记录5min内眨眼次数。

统计学分析:采用SPSS16.0统计软件处理,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据采用两独立样本 t 检验进行统计分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 色谱结果 所有样品检验经方法学验证,线性关系良好($r \geq 0.9984$),精密度 $\leq 1.5\%$,回收率在99.2%~100.8%。地塞米松保留时间为6min。

2.2 角膜表观渗透系数 合成冰片对地塞米松在完整角膜及去上皮角膜的表观渗透系数的影响见表1。在完整角膜,与对照组相比,合成冰片使地塞米松的角膜表观渗透系数增加2.40倍。冰片可提高地塞米松在完整角膜的渗透系数,差异有统计学意义($t = -3.30, P < 0.05$)。去掉上皮层后,对照组地塞米松角膜渗透与完整角膜对照组相比显著增加差异有统计学意义($t = -9.75, P < 0.05$)。冰片组角膜渗透系数是对照组的1.09倍,但冰片组与对照组相比渗透系数差异无统计学意义($t = -0.65, P > 0.05$),合成冰片不能明显提高地塞米松在去上皮角膜的渗透。

2.3 角膜水化 正常角膜水化值范围为76%~80%,超过83%即可判定角膜受到不同程度的损伤。完整角膜水化值对照组为78.83%±0.89%,冰片组为79.68%±0.13%,均在正常值范围内。两组角膜水化值差异无统计学意义($t = -1.90, P > 0.05$),尚不能认为冰片对角膜水化值有影响。

2.4 眼部刺激性 实验中观察到,采用不含冰片、含合成冰片的磷酸缓冲液滴眼后对照组和冰片组白兔5min眨眼次数为5.5±1.05、6.17±0.75次,冰片组眨眼次数略有提高,但差异没有统计学意义($t = 1.37, P > 0.05$),冰片不会明显增加白兔眨眼次数。因此,实验浓度的合成冰片对眼部无刺激性。

3 讨论

地塞米松是一种抗炎效应较强的糖皮质激素,它被广泛用于治疗眼部各种炎症性疾病。另外,地塞米松也是一种新生血管抑制剂,被用于眼表及眼内各种血管新生性疾病的治疗。为了避免激素的副作用,眼科医生多

采用局部给药方式,但是,研究表明地塞米松眼局部给药较难进入眼内达到有效治疗浓度。因而限制了它在眼内疾病方面的应用。

角膜屏障是眼表用药的第一道致密屏障,同时,跨角膜转运也是局部用药后药物进入眼内的一条重要途径。上皮层是角膜脂质最丰富的部分,而且细胞间有紧密连接,药物很难通透。正如本实验观察到的,去掉角膜上皮层后地塞米松通透率显著增加和提高,说明角膜上皮层是模型药物地塞米松的主要屏障。有效的角膜渗透促进剂首先应进入上皮层,才能起到增加药物的溶解度或扩散性的作用。角膜渗透性最大的药物的最佳油-水分配系数对数范围是2~3。由于冰片的 $\text{LogP}(\text{o/w}) = 2.85^{[10]}$,所以它可以迅速地分配到上皮层从而通过某种机制影响角膜的渗透。因此,推测冰片主要作用在角膜上皮层而发挥促渗作用。

对于大多数眼用药物,被动扩散是通过角膜的主要方式。药物通过角膜有两种途径:穿细胞途径和细胞旁途径。依据 $\text{LogP}(\text{o/w})$ 值将药物分为两类:脂溶和水溶。地塞米松 $\text{LogP}(\text{o/w}) = 1.95$ 为脂溶性药物。实验结果表明冰片能提高脂溶性药物地塞米松的角膜渗透。

其原因可能是由于冰片可以改变角膜上皮细胞膜脂质分子的排列,使细胞膜磷脂分子链排列有序性增大,药物分子穿越膜受到磷脂分子的碰撞机会减少,从而使角膜上皮细胞膜的通透性增加^[11]。

采用电镜观察体外培养的马丁达比狗肾上皮细胞,发现合成冰片能明显使上皮细胞间紧密连接松散,使物质经细胞间通道转运加速^[12]。因此冰片促渗透机制也可能是作用于上皮细胞间的紧密连接,使模型药物经细胞旁路迅速通过上皮层。

角膜上皮与内皮控制向基质层的水运输,如果上皮或内皮层受到损伤,额外的水分就会进入基质层,导致角膜水肿。角膜水化水平是体外试验衡量角膜刺激性的一个重要指标。本实验表明,合成冰片不会引起角膜水化增加,对离体角膜没有刺激性。

合成冰片物美价廉,与其它眼用渗透促进剂相比,其优势在于它本身具有治疗眼疾的功效,而且长期的临床实践及实验^[13]已证明其眼部用药的安全性,所以合成冰片将是一种很有应用前景的角膜渗透促进剂。

参考文献

- 1 Pinheiro FI, Araújo-Filho I, Meneses do Rego AC, et al. New drug delivery system for corneal administration of mitomycin-C. *J Cataract Refract Surg* 2016;42(8):1216-1223
- 2 Üstündag - Okur N, Gökçe EH, Bozbiyik DI, et al. Novel nanostructured lipid carrier-based inserts for controlled ocular drug delivery: evaluation of corneal bioavailability and treatment efficacy in bacterial keratitis. *Expert Opin Drug Deliv* 2015;12(11):1791-1807
- 3 Cai Z, Hou S, Li Y, et al. Effect of borneol on the distribution of gastrodin to the brain in mice via oral administration. *J Drug Target* 2008;16(2):178-184
- 4 Xiao YY, Ping QN, Chen ZP. The enhancing effect of synthetical borneol on the absorption of tetramethylpyrazine phosphate in mouse. *Int J Pharm* 2007;337(1-2):74-79
- 5 Li F, Feng J, Cheng Q, et al. Delivery of 125I-cobrotoxin after intranasal administration to the brain: a microdialysis study in freely moving rats. *Int J Pharm* 2007;328(2):161-167
- 6 Wu CJ, Huang QW, Qi HY, et al. Promoting effect of borneol on the permeability of puerarin eye drops and timolol maleate eye drops through the cornea *in vitro*. *Pharmazie* 2006;61(9):783-788
- 7 Chen GL, Lei M, Zhou LP, et al. Borneol Is a TRPM8 Agonist that Increases Ocular Surface Wetness. *PLoS One* 2016;11(7):e0158868
- 8 欧阳丽影,杨铮,张肖宁,等.薄荷醇对黄芩苷角膜透过性的影响. *药物分析杂志* 2014;34(2):234-237
- 9 Liu Z, Pan W, Nie S, et al. Preparation and evaluation of sustained ophthalmic gel of enoxacin. *Drug Dev Ind Pharm* 2005;31(10):969-975
- 10 Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrance materials review on borneol. *Food Chem Toxicol* 2008;46(11):S77-S80
- 11 樊岚岚,唐由之,陆丽珠.冰片促秦皮甲素透过兔角膜上皮细胞实验研究. *中国中药杂志* 2003;28(1):81-82
- 12 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. *中国中西医结合杂志* 2004;24(7):632-634
- 13 杨洪滨,寻延滨,张小宇,等.局部应用天然与合成冰片的眼刺激性与长期毒性. *国际眼科杂志* 2008;8(11):2228-2231