

雷公藤甲素脂质体的制备及对蛙上颌黏膜纤毛毒性研究

张岚¹, 闫敏², 谭晓柯¹, 陈坤¹, 严银银³, 张振强², 朱鑫¹, 宋军营², 谢治深²,
张紫娟², 武香香², 曾华辉²

(¹河南中医药大学药学院, 郑州 450046; ²河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046;

³河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046)

摘要: 目的: 制备雷公藤甲素脂质体, 并考察其对蛙上颌黏膜纤毛的粘附性和毒性。方法: 采用薄膜分散法制备雷公藤甲素脂质体, 并对其进行质量评估。以在体蛙上颌黏膜为模型, 研究不同给药剂量下雷公藤甲素及其脂质体对蛙上颌黏膜纤毛的影响, 评价脂质体药物的毒性及粘附性。结果: 制备的雷公藤甲素脂质体在电镜下呈圆粒状且分布均匀, 平均粒径(90.04±7.36) nm, 包封率为(62.34±7.29)%; 相较溶剂对照组, 雷公藤甲素中、高剂量组与雷公藤甲素脂质体高剂量组的纤毛持续运动及转运速率显著下降($P<0.01$); 脂质体组相较雷公藤甲素原药各剂量组的纤毛持续运动时间显著延长($P<0.01$), 且显微镜下纤毛排列更整齐活跃。结论: 在完善雷公藤甲素脂质体制备工艺条件下, 雷公藤甲素脂质体比原药对纤毛损伤小, 且粘附性好, 能起到明显减毒增效作用。

关键词: 雷公藤甲素; 脂质体; 纤毛毒性; 粘附性

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.U1604185), 河南省科技攻关项目(No.182102410012, No.192102310440), 河南省高校科技创新人才支持计划(No.20HASTIT050), 河南省高等学校重点科研项目(No.19A360021, No.19A360002, No.20B350003), 2020年河南中医药大学科研苗圃工程项目(No.MP2020-13)

Study on preparation of triptolide liposomes and its toxicity to maxillary cilia of frog

ZHANG Lan¹, YAN Min², TAN Xiao-ke¹, CHEN Kun¹, YAN Yin-yin³, ZHANG Zhen-qiang²,
ZHU Xin¹, SONG Jun-ying², XIE Zhi-shen², ZHANG Zi-juan²,
WU Xiang-xiang², ZENG Hua-hui²

(¹Pharmacy College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; ²Academy of Chinese Medicine

Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; ³School of Basic Medicine,

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Objective: To prepare triptolide liposome and investigate its adhesion and toxicity to the mucociliary of maxillary mucosa of frog. Methods: Liposomes of triptolide was prepared by thin-film dispersion method and its quality was evaluated. To study the effects of triptolide and its liposomes on the mucociliary of frog's maxilla, and to evaluate the toxicity and adhesion of the liposomes. Results: The prepared liposome of Tripterygium wilfordii was round and evenly distributed under electron microscope, with an average particle size (90.04±7.36) nm, encapsulation efficiency (62.34±7.29)%; Compared with the solvent control group, the continuous movement and transport rate of cilia in middle and high dose triptolide group and high dose triptolide liposome group decreased significantly ($P<0.01$); Compared with each dose of triptolide, the duration of cilia in liposome group was significantly prolonged ($P<0.01$), and the cilia arrangement was more neat and active under microscope. Conclusion: Under the condition of improving the preparation process of triptolide liposome, triptolide liposome has less damage to cilia than the original drug, and has good adhesion, which can obviously reduce toxicity and increase efficiency.

通信作者: 曾华辉, 河南省郑州市金水东路156号河南中医药大学中医药科学院, 邮编: 450046, 电话: 0371-8656286

E-mail: hhzeng@haactm.edu.cn

Key words: Triptolide; Liposomes; Ciliary toxicity; Adhesion

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.U1604185), Scientific and Technological Brainstorm Project of Henan Province (No.182102410012, No.192102310440), Program for Science & Technology Innovation Talents in Universities and Colleges of Henan Province (No.20HASTIT050), Educational Committee Foundation of Henan (No.19A360021, No.19A360002, No.20B350003), Key Scientific Research Foundation of the Higher Education Institutions of Hubei Province (No.MP2020-13)

雷公藤甲素 (triptolide, TP) 是来源于中药雷公藤根的一种具有多种生物活性的二萜内酯, 具有抗炎、抗类风湿、抗老年痴呆等作用, 但也会造成胃肠溃疡、肝肾毒性等诸多不良反应^[1-3], 因而选择一种载药量大、生物兼容性好且体内可降解的药物载体非常关键。本课题组前期研究表明, 由脂质体包裹TP可显著提高药物的溶解度、稳定性和生物利用度, 定位靶向作用于病所, 此外脂质体具有良好的生物粘附特性, 能富集于病所^[4-6]。采用脂质体为载体并通过鼻腔黏膜给药方式, 在治疗脑病方面, 有着其他给药方式不可比拟的优势^[7-8], 可绕过血脑屏障更高效地到达病所, 但经鼻给药需考虑对鼻腔内组织损害的影响。在体蛙上颞黏膜作为纤毛毒性研究的常用方法, 操作可行性强, 结果可靠, 是药物经鼻给药研究纤毛毒性的重要模型^[9-11]。本实验在完善雷公藤甲素脂质体 (triptolide liposome, TPL) 的制备基础上, 考察雷公藤甲素及其脂质体对在体蛙上颞黏膜纤毛的毒性大小, 及脂质体的粘附性评价, 为经鼻给药治疗脑部炎症性疾病提供有价值的参考。

材料与方 法

1. 动物 普通级牛蛙48只, 体质量250~300g, 雌雄不限, 普通饲养。购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场, 生产许可证号20190002。

2. 试剂与仪器 大豆卵磷脂 (阿拉丁, 批号: B1504087), 胆固醇 (北京百灵威科技有限公司, 批号: LK40Q28), TP (西安昊轩生物公司, 批号: 20170704), 磷酸盐缓冲液 (PBS, Solarbio公司, 批号: 20190328), 0.9%氯化钠溶液 (河南科伦药业有限公司, 批号: C19041804-2), 吐温80 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20190528), 二甲基亚砜 (DMSO, Solarbio公司, 批号: 1121E034), 手动挤压器 (型号: HE8433, Genizer公司), 粒径分析仪 (型号: 250144, Brookhaven Instruments), 高倍显微镜 (型号: TS100, Nikon), 精密电子秤 (型号: AL204, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 透射电子显微镜[型号: JEM-1230 (HC)]。

3. TPL的制备方法和质量控制 用薄膜分散法制备脂质体^[12-14], 精密准确称取大豆卵磷脂16mg、胆固醇4mg、雷公藤甲素0.4mg加入适量的有机溶剂超声溶解, 在40℃恒温水浴中, 20r/min旋转减压蒸发20min, 形成均匀的一类脂薄膜, 真空干燥4h; 再加入磷酸盐缓冲液PBS 10mL, 常温搅拌2h后, 置于100W超声5min, 用手动挤压器依次过200nm、100nm的滤膜, 采用50000MWCO的超滤管二次超滤后上液即为TPL; 使用透射电镜观察脂质体的形态, 粒径分析仪测得脂质体平均粒径; 使用高效液相色谱法 (HPLC)^[15]测得药物含量, 计算包封率, 公式为:

$C包(\%) = C包入的药物量 / C总加入的药物量 \times 100\%$ 。

4. 分组及给药方法 雷公藤甲素组: A: 溶剂 (PBS+DMSO) 对照组, B: 高剂量组 (0.1mg/mL), C: 中剂量组 (0.05mg/mL), D: 低剂量组 (0.025mg/mL); 雷公藤甲素脂质体组: E: 溶剂对照 (PBS) 组, F、G、H: 高、中、低剂量组分别对应原药组剂量。每组6只, 雌雄不限; 将牛蛙椎管中的脊髓捣毁后固定于蛙板上, 用棉签将牛蛙的口腔撑起, 使之张开不闭合, 角度 $\geq 60^\circ$, 上腭部保持平直, 将0.5mL上述药物分别滴加于各组牛蛙上腭部, 充分接触30min。

5. 纤毛转运速率 (CTR) 操作方法 用25℃ 0.9%氯化钠溶液洗净药物, 脱脂棉沾干, 棉签浸墨汁轻点在上腭靠前方部位 (即硬腭靠近黎骨处牙齿部位的正中线) 即刻计时。此时, 墨汁将从硬腭的前面朝后运动。将圆规张开一定角度, 分别位于一定时间内墨汁传送的起始位置, 记录尺上测得其长度 (mm), 并计算CTR (mm/s) 和相对传输速率 (RTR): $RTR = \text{受试组CTR} / \text{溶剂对照组CTR}$ 。

6. 纤毛持续运动时间 (PVD) 操作方法 小心分离上颞黏膜 (3mm×3mm), 尽量避开血管部位, 立即用0.9%氯化钠溶液洗净血污, 黏膜基层平铺于载玻片上, 滴加0.9%氯化钠溶液, 盖上盖玻片, 于光学显微镜下观察纤毛运动情况。随后将载玻片置于25℃的雾化蒸馏水的层析缸中, 密闭。每隔适当时间取出观察, 若纤毛继续运动则放回层析缸中, 至纤毛运动停止^[16-17]。若未能观察纤毛明显摆动, 可在每隔一段时间后, 从层析缸中取出, 用脱脂棉球小心擦干表面的液体 (不伤及表面黏膜组织), 用棉棒沾墨汁在离体腭上轻点, 然后再放于显微镜下找到黑色区域, 观察其是否扩散。记录从给药开始至纤毛运动停止的时间, 此即为PVD, 并计算纤毛持续运动百分率 (PPV)。PPV (%) = 各试验组PVD/溶剂对照组PVD×100%。

结果

1. TPL形态及平均粒径 电镜下脂质体颗粒分布均匀, 呈圆粒状, 可见脂质体典型的环状类指纹的表征, 见图1。粒径仪检测得平均粒径 (90.04±7.36) nm (n=3), 颗粒均匀, 见图2。

2. 脂质体包封率测定 TP在5~80 μg/mL浓度 (x) 时与峰面积 (y) 有良好的线性关系 $y = 28\ 368x - 75.54$ ($r = 0.9994$), 将TPL超滤前总浓度及超滤后上层液及下层液体浓度带入计算, 得包封率为 (62.34±7.29) % (n=3)。

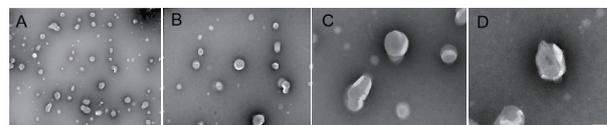


图1 透射电镜下脂质体形态

注: A. ×25 000; B. ×50 000; C. ×100 000; D. ×200 000。

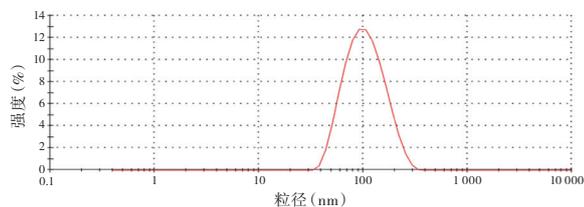


图2 3批样品平均粒径分布图

3. 蛙上颌黏膜纤毛PVD、PPV、CTR、RTR比较 见表1。与雷公藤甲素组溶剂对照组比较,雷公藤甲素低剂量组PVD显著降低 ($P<0.05$);雷公藤甲素中、高剂量组PVD和CTR显著下降 ($P<0.01$);与雷公藤甲素脂质体组溶剂对照组比较,雷公藤甲素脂质体高剂量组PVD显著降低 ($P<0.01$),而高、中、低剂量组CTR显著降低 ($P<0.01$);雷公藤甲素脂质体高、中、低剂量组PVD与雷公藤甲素同浓度组比较时间显著延长 ($P<0.05, P<0.01$)。

表1 给药后蛙上颌黏膜纤毛PVD、PPV、CTR、RTR比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PVD (min)	PPV (%)	CTR (mm/s)	RTR
雷公藤甲素组 溶剂对照组	686.20±9.73	100.00	0.44±0.09	1.00
雷公藤甲素组 低剂量组	662.00±22.76*	98.32	0.41±0.04	0.92
雷公藤甲素组 中剂量组	628.00±25.01**	91.53	0.31±0.03**	0.69
雷公藤甲素组 高剂量组	623.20±6.80**	90.82	0.25±0.03**	0.56
雷公藤甲素脂质体组 溶剂对照组	675.00±10.89	100.00	0.50±0.06	1.00
雷公藤甲素脂质体组 低剂量组	687.20±5.40 [▲]	101.81	0.34±0.03 ^{△△}	0.67
雷公藤甲素脂质体组 中剂量组	688.00±5.34 ^{▲▲}	101.94	0.26±0.01 ^{△△}	0.52
雷公藤甲素脂质体组 高剂量组	652.67±8.23 ^{△△▲▲}	97.12	0.15±0.02 ^{△△}	0.29

注:与雷公藤甲素组溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与雷公藤甲素脂质体组溶剂对照组比较,^{△△} $P<0.01$;与雷公藤甲素组同剂量组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

4. 蛙上颌黏膜纤毛组织显微镜下形态 见图3。与雷公藤甲素溶剂对照组比较,雷公藤甲素低剂量组纤毛组织完整,中、高剂量组纤毛部分有脱落现象,纤毛排列紊乱。雷公藤甲素脂质体低、中剂量组表面纤毛组织结构完整且摆动活跃,高剂量组黏膜表面覆盖较厚的透明层,但纤毛完整摆动整齐。

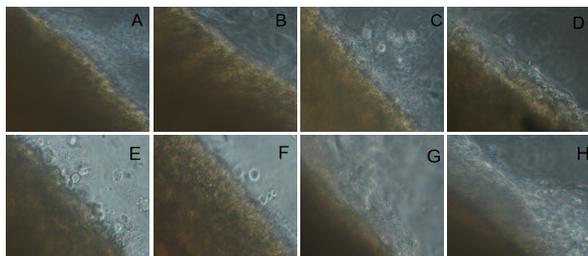


图3 显微镜下蛙上颌黏膜纤毛组织形态(×200)

注: A、B、C、D分别为溶剂(PBS+DMSO)对照组,雷公藤甲素低、中、高剂量组; E、F、G、H分别为溶剂(PBS)对照组,雷公藤甲素脂质体低、中、高剂量组。

讨论

以脂质体为载体的药物可延长其在鼻腔黏膜上的停留时间,具有缓释的效果^[18],更大程度地发挥药效。本实验通过工艺改良得到符合鼻腔给药理想粒径(30~100nm)^[19]的TPL药物,相较TP原药,脂质体药物在相同浓度时对蛙上颌纤毛损伤明显减小,说明TP以脂质体作为载体后能起到明显减毒作用。雷公藤甲素脂质体高剂量组显微镜下可见黏膜纤毛表面覆盖较厚的透明层,影响了纤毛的持续摆动,这与黏膜表面脂质体材料大量堆积有关,且各组纤毛转运速率明显下降,说明脂质体药物有粘附性作用,会增加药物在黏膜表面停留时间。有趣的是,脂质体药物与TP原药都存在使得纤毛转运速率降低,容易产生误区,但对比二者对纤毛持续运动时间及显微镜下纤毛黏膜形态即可佐证笔者研究结果。

蛙上颌黏膜纤毛组织与鼻黏膜纤毛的结构功能类似,且观察方便,因而可作为检验药物对鼻纤毛损伤程度的模型^[20]。相较于离体给药而言,在体给药更能排除外界影响因素,同时可以观察转运速率,再分离观察显微镜下形态及持续运动时间,更加完整和节省材料^[21]。TP原药对蛙上颌黏膜纤毛黏膜有较大的损伤,不适宜直接做鼻黏膜给药,可使用脂质体作为载体,制备脂质体药物既可减少对纤毛黏膜的损伤,且水溶性及粘附性好能更长时间地停留在鼻腔,起到缓释效果,是进行鼻黏膜给药的优选。

在显微镜下观察纤毛运动时,后期纤毛摆动频率降低、幅度减小,很难在镜下直接观察,可以采用墨汁扩散的间接方法来判断纤毛是否仍在运动,但这种方法需要除净黏膜表面液体,防止因液体带动墨汁的扩散,仅此作为后期观察时所用方法。此为在实验过程中摸索的小技巧,以期为做此相关研究的实验者提供一些帮助。

参考文献

- [1] Aggarwal V, Kashyap D, Sak K, et al. Molecular mechanisms of action of tocotrienols in cancer: Recent trends and advancements. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 656
- [2] Yang H, Liu Z, Song Y, et al. Hyaluronic acid-functionalized bilosomes for targeted delivery of tripterine to inflamed area with enhance therapy on arthritis. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 820-830
- [3] 刘斌,樊丹平,舒海洋,等.雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20): 181-190
- [4] Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: An update review. *Curr Drug Deliv*, 2007, 4(4): 297-305
- [5] Alam M I, Beg S, Samad A, et al. Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 40(5): 385-403
- [6] Scalia S, Young P M, Traini D. Solid lipid microparticles as an approach to drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, 12(4): 583-599
- [7] Ezquer Fernando, Quintanilla María Elena, Morales Paola, et al.

- Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived exosomes reduces oxidative stress and markedly inhibits ethanol consumption and post-deprivation relapse drinking. *Addiction Biology*, 2019, 24(5):994–1007
- [8] Ahmed T A, El-Say K M, Ahmed O A, et al. Superiority of TPGS-loaded micelles in the brain delivery of vinpocetine via administration of thermosensitive intranasal gel. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14:5555–5567
- [9] Xu Jinmei, Xiang Qi, Su Junhui, et al. Evaluation of the safety and brain-related tissues distribution characteristics of TAT-HaFGF via intranasal administration. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 37(7):1149–1157
- [10] 王爱娟, 李昕, 王晖. 复方川芎嗪对动物鼻粘膜及纤毛的毒性研究. *中药药理与临床*, 2016, 32(1):141–145
- [11] 苟波娜, 毕青玲, 谢茵, 等. 薄荷素油鼻黏膜保湿微乳的制备及其黏膜黏附性和纤毛毒性研究. *中国药房*, 2019, 30(12):1644–1649
- [12] 余雅婷, 朱卫丰, 金晨, 等. 雷公藤甲素的剂型改进及给药方式研究进展. *中国新药杂志*, 2016, 25(12):1359–1362
- [13] 王淑娟. 雷公藤甲素脂质体的制备及质量的初步研究. 扬州: 扬州大学, 2010
- [14] Li Hong-Ru, Li Shu-Fen, Duan Hong-Quan. Preparation of liposomes containing extracts of *Tripterygium wilfordii* and evaluation of its stability. *中国中药杂志*, 2008, 32(20):2128–2131
- [15] 刘倩芸, 迪娜·吐尔洪, 李新霞, 等. HPLC法测定黄花柳花中5个黄酮类成分的含量. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1):411–414
- [16] 朱艳华, 刘廷荣, 阎雪莹, 等. 磷酸川芎嗪温敏凝胶纤毛毒性的研究. *中医药信息*, 2013, 30(1):11–12
- [17] 杨建红, 张钧寿, 刘铁钢, 维生素B₁₂滴鼻剂的鼻粘膜纤毛毒性评价研究. *中国药科大学学报*, 2002, 33(2):29–31, 33
- [18] 张喜武, 徐坐帝, 李永吉, 等. 丁香苦苷固体脂质纳米粒的药物动力学研究. *中华中医药杂志*, 2019, 34(12):5646–5649
- [19] Xiaoying Zhuang, Xiaoyu Xiang, William Grizzle, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy*, 2011, 10(19):1769–1779
- [20] 张奕, 蒋新国. 鼻腔给药系统的鼻粘膜毒性及解决途径. *中国医药工业杂志*, 2001, 32(7):35–39
- [21] 蒋新国, 崔景斌, 方晓玲, 等. 药物的鼻粘膜纤毛毒性及评价方法. *药学学报*, 1995, 30(11):848–853

(收稿日期: 2019年11月12日)

· 研究报告 ·

基于物质基础的蜻蜓药材质量控制研究

段秀俊¹, 刘培¹, 王伊楠¹, 连云岚², 朴晋华²(¹山西中医药大学, 晋中 030619; ²山西省食品药品检验所, 太原 030031)

摘要: 目的: 进行蜻蜓药材的鉴别、检查及含量测定研究, 为其临床应用及生产使用提供质量保证。方法: 鉴别研究采用显微鉴别及薄层鉴别方法; 水分检查采用烘干法, 总灰分及酸不溶性灰分检查采用炽灼残渣法; 含量测定采用总氮量法及全自动氨基酸分析仪法。结果: 蜻蜓的显微鉴别特征是横纹肌、刚毛、带刚毛的体壁、带毛窝的体壁、体壁碎片、气管壁碎片及复眼碎片。薄层鉴别特征明显, 斑点显色清晰, 分离效果好。水分为7.40%~10.00%, 总灰分为5.48%~6.63%, 酸不溶性灰分为2.28%~2.63%。总氮量为9.85%~10.14%。17种氨基酸的线性相关系数为0.9997~0.9999, 回收率实验RSD为1.90%~2.49%, 平均回收率为97.9%~102.2%。6批蜻蜓药材的17种氨基酸总含量为37.84~93.30mg/g。结论: 建立的显微鉴别、薄层鉴别及含量测定方法专属性强, 重现性好, 水分、总灰分及酸不溶性灰分测定结果准确可靠, 为制订蜻蜓药材质量标准提供实验依据。

关键词: 蜻蜓; 鉴别; 检查; 含量测定; 氨基酸**基金资助:** 山西省地方药材标准 (No.2011003A)**Study on quality control of dragonfly based on material basis**DUAN Xiu-jun¹, LIU Pei¹, WANG Yi-nan¹, LIAN Yun-lan², PIAO Jin-hua²(¹Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; ²Shanxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030031, China)

通信作者: 朴晋华, 山西省太原市小店区龙城大街85号山西省食品药品检验所, 邮编: 030031, 电话: 0351-3179903

E-mail: marypiao@126.com