

盐酸青藤碱传递体的制备及其对大鼠类风湿性关节炎的药效评价

魏 燕, 张永生, 郑杭生*, 费雅蓉, 王 娟, 诸佳珍, 兰济乐

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘要:目的 制备盐酸青藤碱传递体并对其处方工艺进行优化, 验证其对大鼠类风湿性关节炎(RA)的治疗作用。方法 采用乙醇注入法制备盐酸青藤碱传递体, 以传递体的弹性为指标, 通过正交试验优化其处方工艺; 以恒定压力挤出法测定其弹性, HPLC法结合离心超滤法测定其包封率; 于大鼠尾根部sc牛II型胶原建立Wistar大鼠RA模型, 以大鼠踝关节评分、关节肿胀度、血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的水平以及炎细胞浸润、血管翳形成、软骨破坏和骨侵蚀等组织病理形态学的变化来评价传递体对RA的治疗作用。结果 盐酸青藤碱传递体最佳处方为蛋黄磷脂300 mg、胆固醇30 mg、盐酸青藤碱100 mg、脱氧胆酸钠60 mg、维生素E 5 mg、磷酸盐缓冲溶液(pH 8.0) 23 mL、无水乙醇2 mL。以最佳处方制得的传递体的平均粒径为 (83.31 ± 0.08) nm, Zeta电位为 (-32.57 ± 3.27) mV, 弹性指数为 38.69 ± 1.66 , 药物质量浓度为 (2.96 ± 0.27) mg/mL, 包封率为 (39.82 ± 0.97) %。药效实验结果显示, 盐酸青藤碱传递体可显著减轻由RA引起的关节肿胀($P < 0.01$), 显著减少血清中TNF- α 和IL-1 β 的水平($P < 0.01$), 明显减轻炎症反应并有效改善踝关节部位的病理组织形态。结论 所得的盐酸青藤碱传递体制备工艺可行, 质量可控, 疗效确切。

关键词: 盐酸青藤碱; 传递体; 乙醇注入法; 弹性; 类风湿性关节炎; 药效评价; 正交试验; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4872-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.009

Study on preparation of sinomenine hydrochloride transfersomes and their therapeutic effects on rheumatoid arthritis in rats

WEI Yan, ZHANG Yong-sheng, ZHENG Hang-sheng, FEI Ya-rong, WANG Juan, ZHU Jia-zhen, LAN Ji-le

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of sinomenine hydrochloride transfersomes (SHTs) and to verify their therapeutic effects on rheumatoid arthritis in rats. **Methods** SHTs were prepared by ethanol injection method. Their formulation was optimized by an orthogonal test, which was based on the elasticity of transfersomes. Elasticity of transfersomes was measured by constant pressure extrusion method and entrapment efficiency was measured by HPLC combined with centrifugation ultrafiltration. The model of rheumatoid arthritis was established by subcutaneous injection of type II collagen into Wistar rats' tail. The therapeutic effects of the preparation on rheumatoid arthritis in rats were evaluated based on ankle joint score, swelling degree, level of TNF- α and IL-1 β in serum as well as histological changes including inflammatory cell infiltration, pannus formation, cartilage destruction, and bone erosion. **Results** The optimized formulation was as follows: egg phospholipid 300 mg, cholesterol 30 mg, sinomenine hydrochloride 100 mg, sodium deoxycholate 60 mg, vitamin E 5 mg, phosphate buffered saline (pH 8.0) 23 mL, and absolute ethyl alcohol 2 mL. The optimized transfersomes had an average size of (83.31 ± 0.08) nm, Zeta potential of (-32.57 ± 3.27) mV, deformability index of 38.69 ± 1.66 , drug content of (2.96 ± 0.27) mg/mL, and entrapment efficiency of (39.82 ± 0.97) %. The results of pharmacodynamical test revealed that the preparation could significantly reduce joint swelling caused by rheumatoid arthritis ($P < 0.01$) and lower TNF- α and IL-1 β level in serum ($P < 0.01$), effectively alleviate inflammatory response and improve histological changes of ankle joint. **Conclusion** The preparation process for the transfersomes is feasible and their quality can be controlled. The optimized SHTs are effective for treatment of rheumatoid arthritis in rats.

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目基金(2015111458); 高等学校博士学科点专项科研基金(20123322120002); 浙江省教育厅科研项目(Y201431480); 浙江省自然科学基金项目(Y16H280006)

作者简介: 魏 燕(1993—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药经皮吸收新剂型及其体内过程。Tel: (0571)61768157 E-mail: wyhzn@163.com

*通信作者 郑杭生(1973—), 男, 博士, 硕士生导师, 主要从事经皮吸收新剂型及其体内过程研究。

Tel: (0571)61768157 E-mail: hs-zheng@163.com

Key words: sinomenine hydrochloride; transfersomes; ethanol injection method; elasticity; rheumatoid arthritis; efficacy evaluation; orthogonal test; encapsulation rate

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性的自身免疫失调性疾病,其主要特征是关节滑膜炎症和软骨破坏^[1-3]。关节炎症的发生部位主要位于关节结缔组织周围的滑膜衬里层,受细胞因子和趋化因子的调控。促炎因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-17等均可引起骨和软骨的破坏,在RA的发生发展中起到重要作用^[4-5]。目前,临床上用于治疗RA的药物主要包括改善病情的抗风湿药、非甾体抗炎药、甾体激素类药物以及生物制剂等^[6]。然而,长期使用这些药物所产生的副作用如消化道反应、肝肾功能失调以及游离药物进入系统循环所引起的其他全身毒性限制了其在临床上的应用^[7]。

青藤碱(sinomenine, Sin)是从防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 和毛青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. var. *cinereum* Rehd. et Wils. 中提取得到的生物碱单体,药用多为其盐酸盐(sinomenine hydrochloride, Sin-HCl, SH)。SH具有抗炎、抗肿瘤^[8]、免疫抑制、镇痛、镇静、镇咳、促组胺释放、抗心律失常等作用,目前临床上主要用于治疗风湿性关节炎和RA,其作用靶点主要集中在关节滑膜部位^[9-10]。然而,由于Sin本身易分解,对碱、光、热不稳定,且生物半衰期较短,经体循环后到达病变部位药量少,故临床治疗常需长期大剂量使用^[11-12];且该药在体内可通过促进组胺释放而易引起皮疹、胃肠道等不良反应^[12-13]。透皮给药可以提高病变部位的药物浓度,发挥良好的局部治疗作用,减少系统性不良反应,是一种适合该药的理想给药途径^[12,14-15]。

传递体(transfersomes)又称柔性纳米脂质体,是一种特殊的脂质体,由磷脂双分子层和边缘活化剂(edge activator, EA)构成^[16]。EA(常采用胆酸盐类、Span类、聚山梨酯类等)是一类具有高曲率半径的单链表面活性剂,能使脂质双分子层具有良好的变形性^[17-18]。Cevc^[19]认为普通脂质体无法通过皮肤角质层中狭窄的细胞束间水性通道(约0.4 nm),而传递体作为一种药物载体,能够穿过其自身大小1/5的小孔而不被破坏,可以通过皮肤角质层中适度扩张的水性通道,使药物到达真皮层进而发挥局部治疗作用或入血发挥系统作用,其主要机

制如下:一是传递体能诱导皮肤角质层中细胞束间水性通道扩张至大小约30 nm的小孔;二是传递体具有较小的粒径和高度的形变能力,能自主适应上述小孔;三是未封闭皮肤天然存在的水化梯度是传递体通过皮肤水性通道的动力。故本课题组将SH制成传递体经皮给药制剂,以期提高关节病变部位的药物浓度,发挥良好的局部治疗作用,为临床治疗RA提供新的给药途径与思路。本实验以SH传递体(SHTs)的弹性为指标,优化其处方工艺,并对制剂治疗RA作用进行评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-2130 高效液相色谱仪、LC-2030 紫外检测器,上海天美科学仪器有限公司;Xtimate C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),月旭科技股份有限公司;Nano-ZS90 粒径分析仪,英国Malvern公司;85-2 数显恒温磁力搅拌器,上海江星仪器有限公司;聚碳酸酯径迹蚀刻膜(0.10、0.05 μ m),英国Whatman公司;梅特勒FG2 便携式pH计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;JEM-1200EX 型透射电镜,日本Jeol公司;HOMOEX-25 高压膜挤出仪,上海赫默仕机电科技有限公司;BS124S 电子天平,德国萨多利斯公司;5804R 冷冻离心机,德国Eppendorf公司;PALL Nanosep 离心超滤浓缩管,截留相对分子质量10 000,美国Pall公司;YLS-7C 足趾容积测量仪,济南益延科技发展有限公司。

1.2 试剂

SH,标示质量分数为98%,批号Bsy090415,西安博胜生物科技有限公司;Sin 化学对照品,质量分数>98%,批号110774-200507,中国食品药品检定研究院;胆固醇(CH,注射级,批号B40936)、蛋黄卵磷脂(EPC, PL-100M,注射级,批号EK15047,磷脂酰胆碱质量分数>80%),上海艾韦特医药科技有限公司;维生素E(VE),批号082K1382, Sigma公司;脱氧胆酸钠(DOC),批号20160329,国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钾,批号20110801,温州市化学用料厂;磷酸氢二钠,批号130801,湖州湖试化学试剂有限公司;布洛芬搽剂,批号H10940235,沈阳圣元药业有限公司;完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA),

美国 Sigma-Aldrich 公司; 牛 II 型胶原, #20021, 美国 Chondrex 公司; 甲醇, 色谱纯, 美国 Honeywell 公司; HPLC 用水为双蒸水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 Wistar 大鼠, 体质量 (170 ± 20) g, 雌性, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2012-0002。所有动物实验均按照浙江中医药大学动物饲养和使用指南进行。

2 方法与结果

2.1 SHTs 的制备

前期选取了 4 个可能对 SHTs 弹性产生影响的处方因素进行单因素考察: EPC 与 CH 的质量比 ($m_{\text{EPC}}/m_{\text{CH}}$)、EPC 与 DOC 的质量比 ($m_{\text{EPC}}/m_{\text{DOC}}$)、磷酸盐缓冲液 (PBS) 的 pH 值、PBS 的离子强度, 结果显示, 当 $m_{\text{EPC}}/m_{\text{CH}}=6:1$, $m_{\text{EPC}}/m_{\text{DOC}}=5:1$, pH 值为 7.0 时, SHTs 的弹性较好, 而 PBS 的离子强度对弹性没有显著影响, 因此拟定处方如下: EPC 300 mg、CH 50 mg、SH 100 mg、DOC 60 mg、VE 5 mg、PBS (pH 7.0) 23 mL、无水乙醇 2 mL。

采用乙醇注入法制备 SHTs。称取处方量的 VE、EPC、CH 和 DOC, 在超声 (40 kHz, 250 W, 5 min) 处理下溶于 2 mL 的无水乙醇中, 得有机相; 称取处方量的 SH, 溶于处方量的 PBS 中, 得水相。在 25 °C、磁力搅拌 (500 r/min) 下, 将有机相匀速缓慢地注入水相中, 注入完毕后继续搅拌 10 min, 室温下静置 2 h 后, 在氮气压力下依次通过 0.10、0.05 μm 孔径的聚碳酸酯径迹蚀刻膜 (挤出压力分别为 0.05、0.30 MPa), 即得 SHTs。

2.2 SHTs 的理化性质表征

2.2.1 显微形态观察 将 SHTs 样品用 PBS 稀释 10 倍, 取少量滴加至铜网上, 用 2% 磷钨酸溶液负染 3 min, 取出铜网, 用滤纸吸去多余负染液后置于玻璃皿中, 待其自然晾干后, 置于透射电子显微镜 (TEM) 下观察, 拍照。

2.2.2 粒径与 Zeta 电位测定 取 SHTs 样品适量, 用双蒸水稀释 10 倍, 以粒径分析仪测定其粒径与 Zeta 电位, 每个样品平行测定 3 份。

2.2.3 弹性测定 采用恒定压力挤出法测定 SHTs 的弹性^[20], 取“2.1”项下未过膜的 SHTs, 置于高压膜挤出仪中, 在 0.05 MPa 氮气压力下挤压通过 0.10 μm 聚碳酸酯径迹蚀刻膜, 记录 5 min 内的挤出体积并测定挤出后 SHTs 的粒径, 按公式计算其弹性指数 (deformability index, DI), 每个样品平行测

定 3 份。

$$DI = J \times (r_v/r_p)^2$$

J 为 5 min 内挤压过膜的 SHTs 体积, r_v 为挤出后 SHTs 的粒径, r_p 为聚碳酸酯径迹蚀刻膜的孔径

2.3 主药 SH 定量测定及包封率测定

采用 HPLC 法, 以标准曲线法定量测定 SHTs 中主药的量。

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Xtimate C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-乙二胺 (55:45:0.225), 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 265 nm, 以定量环定量进样 10 μL 。

2.3.2 供试品溶液的配制 精密量取 SHTs 样品 200 μL , 置于 10 mL 量瓶中, 加入少量甲醇, 振摇使破乳并溶解, 用流动相定容, 摇匀即得。

2.3.3 标准曲线的制备 精密称取减压干燥至恒定质量的 Sin 化学对照品 5.02 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 200.8 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。分别精密量取储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 10.04、20.08、30.12、40.16、60.24、81.32 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, HPLC 法进样分析, 以峰面积 (A) 为纵坐标、Sin 质量浓度 (C) 为横坐标作图, 并进行线性回归, 得标准曲线: $A = 11\,015\,C - 196.25$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$), 结果表明 Sin 在 10.04 ~ 80.32 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内, 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。按 Sin 与 SH 的相对分子质量将标准曲线定量结果折算为 SH 的量。

2.3.4 方法学考察^[21] 经考察, 方法的精密度、准确度、重复性以及供试品溶液的稳定性均符合要求。

2.3.5 包封率测定 以 HPLC 法结合离心超滤法进行测定^[22], 精密量取 SHTs 待测样品 200 μL , 置于 1.5 mL 离心超滤浓缩管内, 进行冷冻离心 (相对离心力为 $13\,000 \times g$, 温度为 4 °C), 分离并收集全部外水相, 转移至 10 mL 量瓶中, 以流动相定容, 摇匀, 即得外水相药物定量测定供试品溶液; 另精密量取 SHTs 待测样品 200 μL , 按“2.3.2”项下方法制备药物定量测定供试品溶液。按“2.3.1”项下条件分析, 分别计算外水相和取样量 SHTs 中药物 SH 量, 按照公式计算包封率, 每个样品平行测定 3 份。

$$\text{包封率} = (W_S - W_{\text{EA}}) / W_S$$

W_S 为取样量 SHTs 中 SH 的量, W_{EA} 为外水相中 SH 的量

2.4 正交试验优化 SHTs 处方

2.4.1 试验设计与结果 根据预实验及单因素考察结果, 选择 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以 SHTs 的 DI 为指标, 优选 CH 用量 (A)、DOC 用量 (B) 和 PBS pH 值 (C) 的最佳水平, 以确定最佳工艺。正交设计因素及其水平见表 1, 试验安排与结果见表 1, 对试验结果分别进行直观分析与方差分析, 其结果分别见表 1、2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号	A/mg	B/mg	C	D (空白)	DI
1	30 (1)	40 (1)	6.0 (1)	(1)	1.92
2	30 (1)	60 (2)	7.0 (2)	(2)	34.86
3	30 (1)	80 (3)	8.0 (3)	(3)	33.35
4	50 (2)	40 (1)	7.0 (2)	(3)	14.73
5	50 (2)	60 (2)	8.0 (3)	(1)	34.92
6	50 (2)	80 (3)	6.0 (1)	(2)	15.98
7	70 (3)	40 (1)	8.0 (3)	(2)	20.93
8	70 (3)	60 (2)	6.0 (1)	(3)	23.34
9	70 (3)	80 (3)	7.0 (2)	(1)	30.29
K_1	70.13	37.58	41.24	67.13	
K_2	65.63	93.12	79.88	71.77	
K_3	74.56	79.62	89.20	71.42	
R	8.93	55.54	47.96	4.64	

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	13.291 1	2	2.986 3	
B	559.367 0	2	125.681 0	$P<0.01$
C	431.119 3	2	96.865 7	$P<0.05$
D (误差)	4.450 7	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00$$

2.4.2 结果分析与最优处方确定 由直观分析极差 (R) 值可知, 各因素对 DI 的影响大小依次为 $B>C>A$, 即 DOC 用量对 DI 的影响最大, 其次是 PBS 的 pH 值, CH 用量对 DI 的影响最小。其中 A 因素不同水平的影响趋势为 $K_3>K_1>K_2$, B 因素为 $K_2>K_3>K_1$, C 因素为 $K_3>K_2>K_1$ 。由方差分析结果可知, 因素 B 对考察指标有高度影响 ($P<0.01$), 因素 C 有显著影响 ($P<0.05$), 而因素 A 影响不显著 ($P>0.05$)。结合表 1 与表 2, 虽然因素 A 中 K_3 最大, 但考虑到 K_1 对应 CH 用量较少, 可节约成本,

故 A 因素选择 A_1 。综合其他两因素的最佳水平, $A_1B_2C_3$ 条件下可得最优处方, 即 EPC 300 mg、CH 30 mg、SH 100 mg、DOC 60 mg、VE 5 mg、PBS (pH 8.0) 23 mL、无水乙醇 2 mL。

2.4.3 最优处方验证 对“2.4.2”项下最优处方进行验证, 试验重复 3 次。测得 SHTs 的平均粒径为 (83.31 ± 0.08) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.062 ± 0.017 , Zeta 电位为 (-32.57 ± 3.27) mV, DI 为 38.69 ± 1.66 , SH 量为 (2.96 ± 0.27) mg/mL, 包封率为 $(39.82\pm0.97)\%$ 。SHTs 的 TEM 图、粒径和 Zeta 电位分布图见图 1~3。

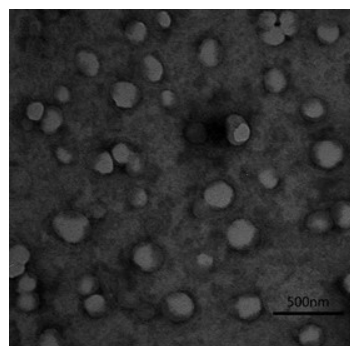


图 1 SHTs 的 TEM 图

Fig. 1 TEM of SHTs

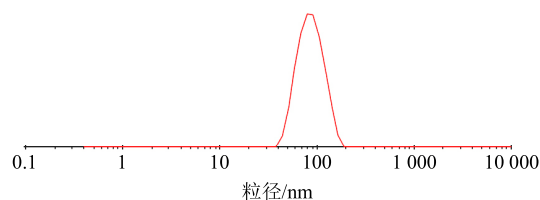


图 2 SHTs 的粒径分布图

Fig. 2 Size distribution of SHTs

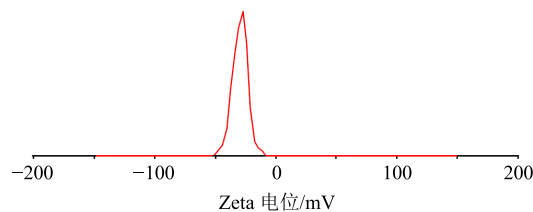


图 3 SHTs 的 Zeta 电位分布图

Fig. 3 Zeta potential of SHTs

2.5 普通脂质体的制备

由于传递体是一种特殊的脂质体, 普通脂质体加入边缘活化剂后被称为传递体, 传递体和普通脂质体的制备方法相同, 包括薄膜分散法、乙醇注入法、pH 梯度法等, 本实验 2 种制剂均采用乙醇注入法制备。制备 SH 普通脂质体, 用作药效实验的参

比制剂,其处方如下: EPC 300 mg、CH 30 mg、SH 100 mg、VE 5 mg、PBS (pH 8.0) 23 mL、无水乙醇 2 mL。采用乙醇注入法进行制备,其工艺如下:称取处方量的VE、EPC和CH,在超声处理(40 kHz, 250 W, 5 min)下溶于2 mL的无水乙醇中,得有机相;称取处方量的SH,溶于PBS中,得水相。在25℃、磁力搅拌(500 r/min)下,将有机相匀速缓慢地注入水相中,注入完毕后继续搅拌10 min,静置2 h后,在氮气压力下依次通过0.10、0.05 μm孔径的聚碳酸酯径迹蚀刻膜(挤出压力分别为0.60、0.80 MPa),即得。

按“2.2”项下方法测得SH普通脂质体的平均粒径为(97.53±0.29) nm, PDI为0.093±0.017, Zeta电位为(-27.87±1.86) mV, DI为0, SH量为(2.59±0.28) mg/mL, 包封率为(28.20±1.32)%。

2.6 SHTs对大鼠RA的药效评价

2.6.1 大鼠RA模型的制备 通过抗原诱导方式制备Wistar大鼠RA模型。称取牛II型胶原10 mg,溶于5 mL 0.05 mol/L的醋酸溶液中,温和搅拌,4℃过夜,即得质量浓度为2 mg/mL的胶原溶液。

第0天,将胶原溶液和CFA等体积混合成乳剂,采用三点注射法在大鼠尾根部sc 0.4 mL乳剂,此为初次免疫。第14天,将胶原溶液和IFA等体积混合成乳剂,采用两点注射法在大鼠尾根部sc 0.2 mL乳剂,此为加强免疫。初次免疫后每周记录大鼠关节评分,以判断造模是否成功。

2.6.2 关节评分 参照文献方法^[23],采用0~4级关节评分法对大鼠RA模型进行评分:0分,无红斑和关节肿胀迹象;1分,踝关节或脚掌中部有红斑或轻度肿胀;2分,踝关节至脚掌中部有红斑和肿胀;3分,踝关节和足跖关节有红斑和中度肿胀;

4分,踝关节至脚有红斑和严重肿胀。关节评分为四肢评分总和,用关节炎指数(arthritis index, AI)表示,当AI>4时被认为造模成功(AI≤16)。

2.6.3 分组与给药 将造模成功的大鼠随机分为5组,分别为模型组、SHTs组(实验组)、SH普通脂质体组(参比制剂组)、空白传递体组(基质对照组)和布洛芬搽剂组(阳性对照组)。另设1组未造模的大鼠作为对照组,共6组,每组10只。

于造模成功后开始给药(给药方式为经皮给药,给药部位统一为大鼠右后肢,给药面积为1 cm×1 cm),参照文献方法^[24-25],实验组给予最优处方SHTs 720 μL/d [Sin剂量为10 mg/(kg·d)],基质对照组给予空白传递体 720 μL/d,参比制剂组给予普通脂质体 720 μL/d [Sin剂量为10 mg/(kg·d)],阳性对照组给予布洛芬搽剂 720 μL/d [布洛芬剂量为200 mg/(kg·d)],模型组与对照组分别给予生理盐水 720 μL/d。各实验组1 d的剂量分2次给药,每次360 μL,共给药2周。

2.6.4 足趾容积测量 给药后1、4、7、9、12、14 d测量各组大鼠右后肢的关节肿胀度,关节肿胀度以足趾容积表示,足趾容积用足趾容积测量仪测定。测定结果见表3。由表3可见,给药14 d后,各组大鼠关节肿胀度均有不同程度下降,其中以实验组和阳性对照组下降最为明显,参比制剂组次之,模型组和基质对照组稍弱。与对照组相比,各组大鼠右后肢肿胀度均较高($P<0.01$),表明造模成功且模型持续存在。与模型组相比,实验组和阳性对照组大鼠关节肿胀度显著下降($P<0.01$),基质对照组也显著下降($P<0.05$)。

2.6.5 炎症因子测定 连续给药14 d,于第15天腹主动脉取血3 mL,3 000 r/min离心10 min,分离血

表3 给药后大鼠右后肢足趾容积测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Right hind paw volume of rats after drug application ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	足趾容积/mL					
	给药1 d	给药4 d	给药7 d	给药9 d	给药12 d	给药14 d
对照	1.46±0.30	1.37±0.15	1.36±0.05	1.43±0.08	1.44±0.07	1.38±0.12
模型	2.33±0.17 ^{▲▲}	2.17±0.19 ^{▲▲}	2.11±0.12 ^{▲▲}	2.10±0.12 ^{▲▲}	2.05±0.13 ^{▲▲}	1.93±0.11 ^{▲▲}
基质对照	2.27±0.15 ^{▲▲}	2.12±0.19 ^{▲▲}	2.04±0.11 ^{▲▲}	2.10±0.11 ^{▲▲}	1.93±0.07 ^{***}	1.88±0.11 ^{*▲▲}
实验	2.26±0.11 ^{▲▲}	2.03±0.16 ^{*▲▲}	1.92±0.29 ^{*▲▲}	1.96±0.15 ^{**▲▲}	1.89±0.13 ^{**▲▲}	1.78±0.10 ^{***}
参比制剂	2.29±0.11 ^{▲▲}	2.04±0.09 ^{▲▲}	2.00±0.09 ^{▲▲}	2.01±0.10 ^{▲▲}	1.98±0.10 ^{▲▲}	1.90±0.07 ^{▲▲}
阳性对照	2.28±0.13 ^{▲▲}	2.00±0.10 ^{*▲▲}	1.93±0.14 ^{*▲▲}	1.89±0.10 ^{**▲▲}	1.82±0.10 ^{**▲▲}	1.77±0.09 ^{***}

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与对照组比较: ▲▲ $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; ▲▲ $P<0.01$ vs normal group

清, 采用 ELISA 法分别测量血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的量, 具体操作按照试剂盒说明书进行。测量结果见表 4, 与对照组大鼠相比, 各组大鼠的血清 TNF- α 和 IL-1 β 量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明造模成功; 与模型组相比, 实验组与阳性对照组大鼠的血清 TNF- α 和 IL-1 β 量均显著下降 ($P < 0.01$), 且实验组较阳性对照组下降更显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

2.6.6 组织形态学观察 于给药后第 15 天处死大鼠, 取大鼠踝关节, 经固定、脱水、包埋、切片及 HE 染色后于光学显微镜下观察踝关节滑膜、软骨、

表 4 大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的定量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	91.74 $\pm$ 12.98	13.13 $\pm$ 1.64
模型	239.82 $\pm$ 16.38 ^{▲▲△△}	30.44 $\pm$ 1.81 ^{▲▲△△}
基质对照	218.22 $\pm$ 9.63 ^{▲▲△△}	26.81 $\pm$ 1.38 ^{**▲▲△△}
实验	121.43 $\pm$ 13.26 ^{**▲△}	16.00 $\pm$ 1.13 ^{**▲▲△△}
参比制剂	192.14 $\pm$ 10.42 ^{▲▲△△}	23.35 $\pm$ 1.19 ^{**▲▲△△}
阳性对照	157.34 $\pm$ 14.19 ^{**▲▲}	19.67 $\pm$ 1.05 ^{**▲▲}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$; 与阳性对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs normal group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs positive group

骨的病理改变, 并从炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨破坏和骨侵蚀 4 个方面进行病理学分析。

实验结果如图 4 所示, 对照组大鼠踝关节滑膜衬里层细胞结构完整, 排列规则 (1~2 层, 多呈单层), 滑膜细胞下可见多层脂肪细胞; 未见炎性细胞浸润和血管翳形成; 软骨透明且表面光滑, 未见软骨破坏及骨侵蚀, 关节腔间隙明显可见, 关节结构完整。模型组大鼠踝关节滑膜细胞增生、肥厚; 滑膜内有大量炎细胞浸润, 伴有血管翳形成; 关节表面透明软骨遭到破坏, 骨侵蚀严重, 关节腔间隙不可见, 关节结构不完整。实验组与模型组相比, 滑膜增生明显减少, 脂肪细胞清晰可见; 炎性细胞浸润明显减少, 未见血管翳形成; 软骨及骨破坏较轻, 关节腔间隙清晰可见, 与对照组相比恢复良好。阳性对照组与模型组相比, 滑膜增生和炎性细胞浸润及血管翳形成得到改善, 但仍可见软骨表面破坏、骨侵蚀严重、关节腔间隙狭窄。参比制剂组和基质对照组尚可见滑膜细胞增生、肥厚, 并伴有大量炎性细胞浸润及血管翳生成; 关节表面透明软骨破坏和骨侵蚀严重, 关节腔间隙不可见, 恢复效果不佳。

2.6.7 统计方法 所有测定数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据之间的比较采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。

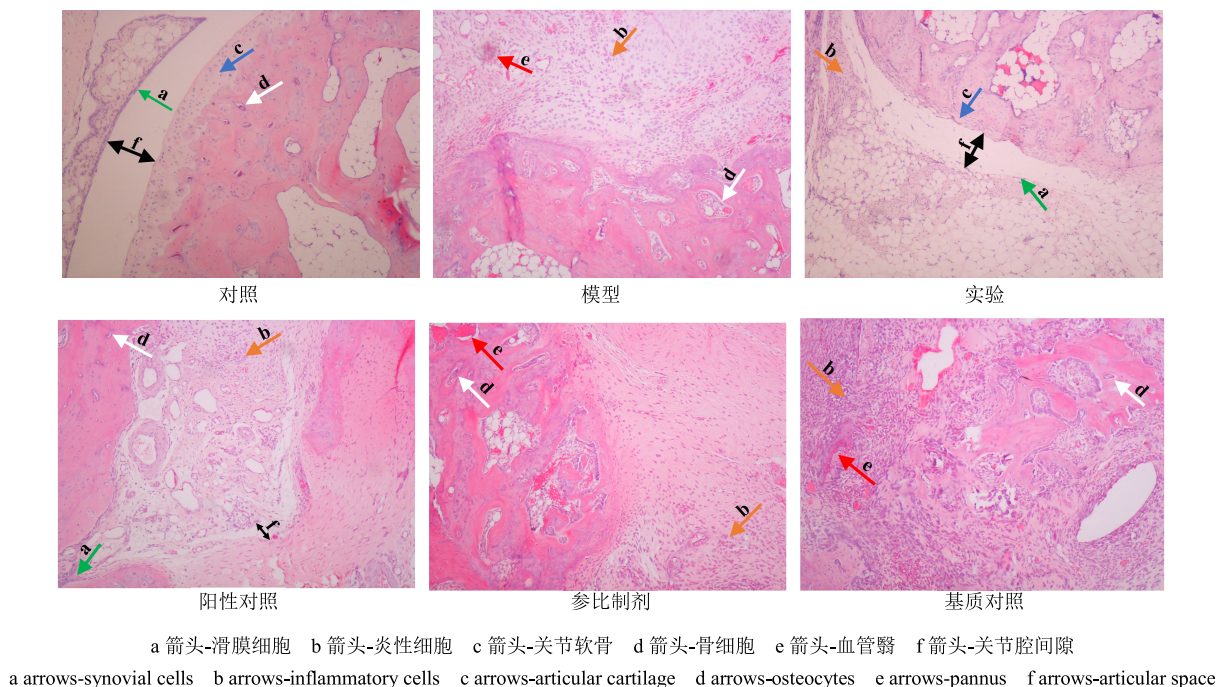


图 4 大鼠踝关节 HE 染色结果

Fig. 4 HE staining results of rats' ankle joint

3 讨论

传递体的制备方法有很多,包括薄膜分散法^[16]、乙醇注入法^[12]、逆向旋蒸法^[26]与超声波分散法等。本实验前期考察了薄膜分散法和乙醇注入法2种方法,结果发现采用前者制备 SHTs 时,有机溶剂用量较大,且药物在有机溶剂中溶解度较低,混合时呈乳白色混悬液,旋转蒸发后药物不易与脂质膜材融合成为均匀的薄膜,制得的传递体粒径较大,弹性较差;而采用后者制得的传递体粒径较小,弹性较好,且该法操作简单、重复性好、乙醇用量少,易于实现大批量生产,故本实验采用乙醇注入法。

传递体质量评价指标通常包括粒径、弹性与包封率等。根据 Cevc 提出的传递体皮肤穿透理论^[19],载体的粒径必须足够小(150 nm 以下才有可能穿透皮肤),弹性必须足够大。不同的粒径可能对载体穿透皮肤有影响,但是在处方合适的前提下,载体的粒径可以通过挤压过膜来控制,故传递体粒径不作为处方优化的指标。作为药物经皮渗透的载体,传递体包封率对其中药物皮肤渗透会产生影响,然而有研究表明未被包封于传递体中的“游离”药物可通过与脂质囊泡结合的方式或随脂质囊泡进入皮肤,即“封闭效应”^[27],故包封率亦不作为传递体处方优化的指标。弹性与传递体处方组成,特别是其中 DOC、磷脂与 CH 等的用量密切相关,故传递体处方优化宜采用弹性作为指标。

RA 是一种慢性、炎症性的自身免疫性疾病,其病理特征表现为滑膜增生、炎症细胞浸润、血管翳形成、软骨破坏和骨侵蚀等^[7,28]。一方面,RA 的发生发展与遗传基因的位点有很大关系,其中较为明确的位点是编码主要组织相容性复合体 II 类(MHC II)分子基因^[29];另一方面,滑膜细胞通过合成多种细胞因子和趋化因子,在 RA 的发病机制中起着重要作用,血清中 TNF- α 、IL-1 β 量升高与 RA 活动密切相关^[30]。TNF- α 和 IL-1 β 主要由单核细胞和巨噬细胞产生,两者被称为是“姊妹细胞因子”,具有生物协同效应^[31]。TNF- α 具有刺激滑膜细胞和软骨细胞合成前列腺素(PEG₂)和胶原酶的作用,可诱导 IL-1、IL-6、 γ -干扰素的产生,引起骨和软骨的破坏,促进成纤维细胞的增生及血管翳生成;IL-1 β 是 IL-1 家族中的一员,它通过调节多种细胞因子、细胞黏附分子、免疫调节分子等的表达,导致滑膜增生肥厚、炎症细胞浸润、软骨破坏和骨侵蚀^[32]。本实验中,与对照组相比,模型组大鼠

血清 TNF- α 和 IL-1 β 量均显著升高($P<0.01$),RA 的病理特征明显且持续存在;与模型组相比,经 SHTs 和布洛芬搽剂治疗后,血清 TNF- α 和 IL-1 β 量显著下降($P<0.01$),RA 的病理特征均得到有效改善,表明实验组制剂和阳性药均可抑制 TNF- α 和 IL-1 β 生成,减轻炎症反应发生,促进骨和软骨的修复,且 SHTs 抗炎效果优于布洛芬搽剂;与普通脂质体和空白传递体相比,SHTs 用药后血清 TNF- α 和 IL-1 β 量下降更显著($P<0.01$),对 RA 的病理特征改善更明显,揭示了 SHTs 剂型选择的合理性与药物的有效性。

本实验采用乙醇注入法制备 SHTs,并通过正交设计对制剂处方进行优化,所得制剂质量可控。药效试验结果证明,SHTs 对 RA 具有良好的治疗效果。为了进一步阐明制剂的体内过程,以便合理解释制剂的有效性,本研究尚需开展制剂的离体皮肤渗透特性、体内药动力学及药物组织分布等研究。

参考文献

- [1] 张靖,周彬,王彦丽,等. 抗类风湿性关节炎中药的研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2189-2194.
- [2] Iain B, McInnes F R C P, Georg S. Mechanisms of disease the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 23(365): 2205-2219.
- [3] 朱科达,刘风云. 双氯芬酸钠缓释胶囊联合柳氮磺吡啶治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(11): 1358-1362.
- [4] Smolen J S, Aletaha D, Koeller M, et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2007, 370(9602): 1861-1874.
- [5] 孙玉亮,池建淮,万毅,等. 大鼠类风湿性关节炎药效学指标及检测方法 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(2): 136-139.
- [6] Cheng X L, Liu X G, Wang Q, et al. Anti-inflammatory and anti-arthritis effects of Guge Fengtong Formula: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(11): 842-853.
- [7] Sultana F, Neog M K, Rasool M. Targeted delivery of morin, a dietary bioflavonoid encapsulated mannosylated liposomes to the macrophages of adjuvant-induced arthritis rats inhibits inflammatory immune response and osteoclastogenesis [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 115: 229-242.
- [8] 姜宇懋,王丹巧. 青藤碱抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(11): 1866-1870.
- [9] 李乐,张彩玲,宋必卫. 青藤碱的药理研究与临床应

- 用 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(4): 310-313.
- [10] 危红华, 李莎莎, 韩腾飞, 等. 盐酸青藤碱关节腔注射用纳米粒温敏凝胶的制备及其性质考察 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1899-1904.
- [11] 李周, 王利胜, 巴文强, 等. 青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析方法的建立 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2076-2081.
- [12] 王娟, 郑杭生, 魏燕, 等. 盐酸青藤碱挥发油边缘活化 PEG 修饰传递体的离体皮肤渗透研究 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3602-3609.
- [13] 朱士龙, 陈迪钊, 李勇, 等. 青藤碱- β -环糊精包合物的制备及表征 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1328-1332.
- [14] 姜素芳, 胡姣艳, 何丽华. 盐酸青藤碱醇质体的制备及其体外经皮渗透研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1738-1741.
- [15] 夏晓静, 包汝泼, 黄悦. 经去氧胆酸钠修饰的白桦脂酸醇质体的制备及其体外透皮效果研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1407-1411.
- [16] 陈思思, 郑杭生, 王娟, 等. 三七总皂苷传递体的制备及其治疗大鼠急性软组织损伤作用研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2070-2075.
- [17] Honeywell-Nguyen P L, Bouwstra J. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2005, 2(1): 67-74.
- [18] Elsayed M M A, Abdallah O Y, Naggar V F, *et al.* Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322(1/2): 60-66.
- [19] Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 675-711.
- [20] Chaudhary H, Kohli K, Kumar K. Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery [J]. *Int J Pharm*, 2013, 454(1): 367-380.
- [21] 方蓉. 盐酸青藤碱 PEG 修饰传递体的制备及其药动学研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015.
- [22] Ribeiro L N M, Montan M F, Breitreitz M C, *et al.* Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 93: 192-202.
- [23] Song H P, Xin L, Yu R, *et al.* Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(4): 1483-1488.
- [24] 姚瑶, 葛卫红. 青风藤醇提物与青藤碱治疗胶原诱导关节炎大鼠药效的比较研究 [J]. 药学与临床研究, 2014, 22(1): 25-28.
- [25] Zhou L, Meng W, Chen L Y, *et al.* Role of sinomenine on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(6): 429-435.
- [26] 李莎莎, 宋艳丽, 危红华, 等. 传明酸传递体的制备及其性质考察 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3141-3146.
- [27] 郑俊民. 经皮给药新剂型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [28] Zhao J, Liu T, Xu F, *et al.* Anti-arthritic effects of total flavonoids from *Juniperus sabina* on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(47): 178-183.
- [29] McInnes I B, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2328-2337.
- [30] Zeb A, Qureshi O S, Yu C H, *et al.* Enhanced anti-rheumatic activity of methotrexate-entrapped ultradeformable liposomal gel in adjuvant-induced arthritis rat model [J]. *Int J Pharm*, 2017, 525(1): 92-100.
- [31] 王斯日古冷, 斯琴. 哈塔胶囊对风湿及类风湿性关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4489-4491.
- [32] 李玉梅, 陈永强, 樊天佑, 等. 羌活地黄汤对佐剂性类风湿性关节炎大鼠血清 TNF- α 、IL-1- β 、IL-6 的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(2): 12-14.