

# 脂质体包裹对汉防己甲素细胞毒性影响的实验研究

浙江医科大学(杭州 310006) 杨赛丽\* 杜英杰 曾昭玉  
杭州华东制药厂 杨 曦

**摘要** 观察了汉防己甲素在脂质体包裹前后的细胞毒性改变。结果显示,在40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时,汉防己甲素包裹前后对大鼠肺泡巨噬细胞的酵母吸附功能、胞浆游离 $\text{K}^+$ 和 $\text{Ca}^{++}$ 含量和细胞骨架调控能力的影响有明显的不同。提示脂质体包裹可减轻汉防己甲素的细胞毒性。为开发该药的新剂型作了有益的尝试。

**关键词** 汉防己甲素 脂质体 细胞毒性

汉防己属粉防己科,长期来作为祛风止痛、利水消肿及调治痲疹恶疮等药物应用。80年代开始,我国将汉防己甲素用于治疗矽肺,被认为在抑制和逆转矽肺胶原纤维方面有较确切的作用,是一种起效快,适用预防和治疗各期的矽肺的药物。但由于需长期用药,对组织细胞毒性较大,可引起皮肤色素沉着、肝肿大和肝功能异常等副作用,限制了其在临床上的广泛应用。现研究了用脂质体包裹汉防己甲素对大鼠肺泡巨噬细胞毒性作用的影响,为探讨开发该药的新剂型提供实验依据。

## 1 材料

1.1 药品与试剂:汉防己甲素(tetrandrine,简称汉甲),由浙江金华制药厂提供,批号860203。卵磷脂由杭州华东制药厂提供,RPMI-1640购自日本。考马斯亮兰G250为Fluka<sub>1</sub>进口分装。面包酵母由杭州豆制品工厂提供。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物:健康成年Wistar大鼠,体重200g左右,本校实验动物中心提供。

## 2 方法

2.1 汉防己甲素多相脂质体制备:将卵磷脂10g、吐温-80 3.5g和无水乙醇5ml于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中溶解,得I液。胆固醇和油酸各5g加热熔融,得II。汉甲0.2g加蒸馏水35ml,滴加2mol/L盐酸,不断混匀至汉甲全溶,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温,得III。再将I和II合并混匀后,加入III。立即研磨成糊状,补充适量蒸馏水,经高速捣碎机高速搅拌,最后调pH至7.0左右,定容至500ml,呈匀质乳状,分装,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min灭菌。含汉甲400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,实验终浓度为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。经超离心法,测得包封率为78.2%。

2.2 肺泡巨噬细胞(AM)培养:用本室常规法,放血处死大鼠,进行支气管肺泡灌洗,所得细胞悬液离心(1000r/min, 10min),沉淀用Hank's液反复洗涤3次,用RPMI-1640培养液(含10%胎牛血清,100u青霉素/ml,100 $\mu\text{g}$ 链霉素/ml)制备细胞悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下含5% $\text{CO}_2$ 加湿的空气中培养40min,贴壁纯化得单层AM供试。

### 2.3 测定

2.3.1 AM酵母吸附率:采用改良爬片法<sup>[1]</sup>,以 $1 \times 10^6$ 个/ml密度的细胞悬液,贴壁纯化后,使AM与药物在37 $^{\circ}\text{C}$ 共育2.5h,再与面包酵母( $20 \times 10^6$ 个/ml)接触30min,AM经Giemsa染色,镜检。

\*Address, Yang Saili, Zhejiang Medical University, Hangzhou

2.3.2 AM内K<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>含量: 以0.5×10<sup>6</sup>个/ml密度的细胞悬液, 贴壁纯化后, AM与药物在37℃共育19h, 去培养液, 生理盐水轻洗, 加入定量双蒸水, 用反复冻融法至全部细胞破裂, 于火焰原子分光光度仪(Video 22型, 美国IL公司)中测定。

2.3.3 AM骨架网络丧失率: 参照Penal法<sup>[2]</sup>, 以0.5×10<sup>6</sup>个/ml密度的细胞悬液, 贴壁纯化后, 使AM与药物37℃共育3h, 细胞在M缓冲液中漂洗, 0.5% triton-100缓冲液中提取, 自然干燥后2%戊二醛固定, 0.2%可考斯亮兰G250染色, 中性树脂封固, 镜检。

2.4 统计分析: 各组数据以均值±标准差表示( $\bar{x} \pm S$ ), 组间差异用t检验。

### 3 结果

汉甲在脂质体包裹前后的细胞毒性测定结果见表、图。包裹前组的细胞K<sup>+</sup>含量明显低于包裹后组和对照组( $P < 0.01/0.05$ ), 而细胞Ca<sup>2+</sup>含量明显高于包裹后组和对照组( $P < 0.01$ ); 包裹前组的AM酵母吸附率也明显低于包裹后组和对照组( $P < 0.01$ ) (表和图1、2)。包裹前组镜下可见, 多数细胞园缩, 细胞浆内和胞质周边的微管、微丝组成的骨架网络较包裹后组和对照明显减少, 细胞骨架网络丧失率明显高于包裹后组和对照组( $P < 0.01$ )。(表和图3~4)。结果提示, 脂质体能够将汉甲包裹其中。在40μl/ml浓度下, 汉甲经脂质体包裹后, 其药物的原有细胞毒性明显降低。

表 汉甲包裹前后的细胞毒性( $\bar{x} \pm S$ )

指 标	细胞数/样本数	对 照	汉甲包裹	
			前	后
细胞内K <sup>+</sup> 含量 (μg/0.25×10 <sup>6</sup> AM)	5	13.36±0.28	0.60±0.12*	0.77±0.08*Δ
细胞内Ca <sup>2+</sup> 含量 (μg/0.25×10 <sup>6</sup> AM)	5	0.68±0.05	2.68±0.52*	1.29±0.24*ΔΔ
酵母吸附率(%)	1200	82.33±3.35	46.33±1.75*	59.83±1.84*ΔΔ
细胞骨架网络 丧失率(%)	200	19.83±1.47	50.17±2.64*	37.17±2.14*ΔΔ

与对照组比较\* $P < 0.01$ , 与包裹前组比较Δ $P < 0.05$  ΔΔ $P < 0.02$

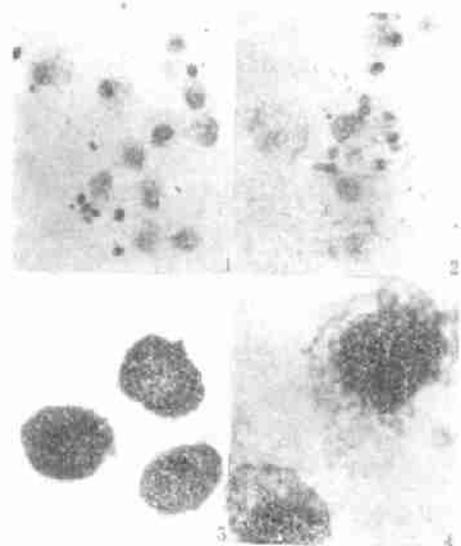


图1 汉甲包裹前组, 能吸附酵母的AM少

图2 汉甲包裹后组, 能吸附酵母的AM较多

图3 汉甲包裹前组, AM内骨架网络少或消失

图4 汉甲包裹后组, AM内骨架网络清晰可见

### 4 讨论

关于汉甲的细胞毒性国内外均有报道。体外研究表明, 5μg/ml汉甲能明显降低AM的存活率<sup>[3]</sup>, 抑制细胞的骨架修饰能力, 使微管解聚<sup>[4]</sup>。同位素标记法测定结果也证明汉甲是钙离子通道抑制剂, 阻抑细胞对Ca<sup>2+</sup>的释放, 使细胞内Ca<sup>2+</sup>稳态失调<sup>[5]</sup>。洪巨伦等报道汉防己碱在65mol/L浓度时, 对大鼠嗜中性白细胞胞浆游离钙水平有明显影响<sup>[7]</sup>。

本研究选用能引起细胞明显中毒的大剂量(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )对AM处理后,见到此剂量下的汉甲能明显阻抑AM的吞噬功能,使细胞吸附酵母的能力大大降低,严重扰乱了细胞内环境渗透压的平衡,使胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 激增,而 $\text{K}^{+}$ 骤降,高度损伤细胞对骨架修饰调控的能力,使细胞骨架网络丧失率明显下降。本文中汉甲对细胞功能和形态的毒性作用与文献报道是一致的。

近年来,随着制剂技术的革新,出现了新的释药系统,脂质体就是其中之一。它能将药物包裹起来,通过细胞的内吞、融合、吸附和脂质交换的作用特点,使药物具有能使用最小剂量,降低到最小副作用,而发挥最大疗效的优点[6],本研究结果表明,脂质体能将汉甲包裹而成为汉甲的药物载体。并发现,制备而成的汉甲多相脂质体可以明显减轻原有游离汉甲的细胞毒性。脂质体包裹后,改善了汉甲对细胞吞噬功能的影响,使细胞对酵母的吸附率明显增加,削弱了汉甲对细胞内环境渗透压的扰乱,使细胞 $\text{K}^{+}$ 明显回升,而 $\text{Ca}^{2+}$ 明显返落,并减轻了汉甲对细胞骨架修饰调控能力的损伤,使细胞骨架网络丧失率明显下降。

总之,用脂质体作为汉甲的药物载体,能明显减轻汉甲原有的细胞毒性。这对解决目前汉甲治疗矽肺中出现较严重的组织细胞毒性作用具有重要意义,是一项具有实用价值的新尝试。汉甲脂质体到达机体后是否能保持汉甲对矽肺的疗效,而又明显降低对肝、肾等组织细胞的毒性,我们的动物实验也取得了阶段结果(另文),值得进一步探讨。

### 参 考 文 献

- 1 杨赛丽,等. 浙江医科大学学报, 1990, 19 (4): 164
- 2 Penal S D J. Cell Biology Interational Reports, 1980, 4(2): 149
- 3 陈宁蒙,等. 卫生研究, 1984, 13(5): 5
- 4 陈宁蒙,等. 卫生研究, 1986, 15(6): 7
- 5 泮竞生,等. 北京医科大学学报, 1987, 19 (3): 177
- 6 林东海,等. 沈阳药学院学报, 1988, 5(3): 217
- 7 洪巨伦,等. 中国药理学报, 1989, 10(6): 533  
(1994-09-19收稿)

## 越桔叶中熊果甙的分离与鉴定

黑龙江中医学院(哈尔滨 150040)

马英丽 田振坤 郭桂彬\* 王 刚

越桔叶为杜鹃花科植物越桔 *Vaccinium vitidacea* L. 的叶, 异名“熊果叶”。近年来临床上将其做成制剂治疗气管炎和肺心病。发现具有较好的镇咳和平喘作用(王刚. 全国第一届中西医结合呼吸病学术交流会论文汇编. 1987. 42) 化学成分预试, 越桔叶含有甙, 黄酮, 鞣质等成分。我们对其甙类成分进行分离得一白色针晶, 经鉴定为熊果甙(arbutin)。文献[张银娣. 药学报, 1982, 17(12): 16]报道, 它具有镇咳作用。

### 1 提取和分离

取干燥越桔叶(采自黑龙江省大兴安岭, 经本院中药系王迪副教授鉴定)粗粉, 用乙醇回流提取2次, 每次2h, 提取液减压回收乙醇, 浓缩至膏状, 加水溶解, 滤除水不溶物, 用乙酸乙酯萃取4~5次, 将萃取液合并, 浓缩, 得萃取物用甲醇溶解, 拌入

聚酰胺粉20g, 经低压聚酰胺柱依次用不同浓度的乙醇洗脱, 得4个部分。将75%乙醇洗脱部分再经硅胶柱分离, 用氯仿-甲醇-水(80:18:2)洗脱, 得白色结晶, 用无水乙醇重结晶。

### 2 鉴定

白色针晶, mp 198~200°C, Molisch反应阳性, 与 $\alpha$ -萘酚浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 反应在溶液界面出现紫色环。与 $\text{FeCl}_3$ 试剂呈淡蓝绿色。将结晶溶于无水乙醇中, 加醇性KOH出现白色沉淀。以上化学反应提示此化合物为酚甙类。UV入 $\frac{\text{MeOH}}{\text{MeX}}$  nm: 225, 828; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1220 (C-O-C), 1480, 1520 (苯环), 2875, 2950 (CH), 3354 (-OH)。MSm/z: 272 ( $\text{M}^+$ ), 主要碎片峰162 (糖基)。由UV, IR及MS等光谱可知该化合物基本母核为苯环, 加上主要碎片峰质量162, 239。用分子离子

(下转第485页)

\* 本院中药系87届毕业生

C-scanning. Four different processes were compared. Result showed that Process C was the best among all.

( Original article on page 463 )

### Preparation of Cuiru Oral Liquid

Ma Shuangcheng, Ni Long, Chen Dechang

Cuiru oral liquid (COL) for the promotion of lactation is prepared from an aqueous extract of *Angelica sinensis*, *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge., *Rehmannia glutinosa* Libosch., et al. Its formulation and processing were briefly described, and the quality standard and stability of the finished product were studied. Results showed that the formulation processing and stability of COL were suitable for clinical trial. Moreover, its pharmacology was briefly described.

( Original article on page 465 )

### Experimental Studies on Liposome Encapsulation in Cytotoxicity of Tetrandrine

Yang Saili, Yang Xi, et al

Changes in the cytotoxicity of tetrandrine before and after liposome encapsulation on rat alveolar macrophages in vitro were observed. Results suggested that there was a significant differentiation on the adsorptive capacity to yeast, and the level in cytoplasmic free calcium and potassium, and the cytoskeletal control of macrophages at the concentration of 40µg/ml. Experiments showed that liposome encapsulation may attenuate cytotoxicity of tetrandrine.

( Original article on page 470 )

### Studies on Narrowleaf Sibiraea (*Sibiraea angustata*) in Regulating Lipid Metabolism

Wang Xiaoli, Guo Jiming, Yang Bingxun

Liu Tea (*Sibiraea angustata*) at doses of 8.5 and 15.0g/kg ig could reduce TG, β-LP, TC and elevate HDL-C levels of normal or hyperlipidemia rat. In vitro experiments indicated that *S.angustata* may promote the catabolism of FFA. The contents of FFA in rat serum showed significant elevation in *S. angustata* treated groups as compared with the control. In addition, fat cells were smaller in *S. angustata* treated rats and mucoid changes could be seen under microscope. These results suggested that *S. angustata* could regulate the metabolism of lipid.

( Original article on page 473 )

### Pharmacological Activity of Nest of Silvestri (*Macrotermes annandalei*)

Bei Weijian, Chen Yong, Chen Chaoshu, et al

Experiments showed that the nest of *Macrotermes annandalei* (Silvestri) had the activity of relieving cough, eliminating phlegm, and bacteriostasis. It could also promote the phagocytosis of macrophages, enhance the transformation of T-cell of lymphocyte and raise the ratio of ANAE cell of lymphocyte in mice.

( Original article on page 476 )