

固体脂质纳米粒降低雷公藤内酯醇肝毒性的实验研究

梅之南, 杨亚江, 徐辉碧, 杨祥良*

(华中科技大学药物研究所, 湖北 武汉 430074)

摘要: 目的 探讨固体脂质纳米粒降低雷公藤内酯醇 (TP) 对肝脏的毒性作用。方法 用雷公藤内酯醇固体脂质纳米粒 (TP-SLN) 小鼠 ig 60 d 后, 测定小鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和肝组织中的超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性以及丙二醛 (MDA) 的含量。结果 与空白组相比, TP-SLN 对 ALT, AST, SOD, GSH-Px, MDA 的活性或含量差异无显著性; 中、高剂量 (20, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的 TP 组则显著降低 SOD 和 GSH-Px 的活性, 并能显著提高 MDA, ALT 和 AST 的含量。结论 TP-SLN 能降低 TP 对肝脏的毒性。

关键词: 固体脂质纳米粒; 雷公藤内酯醇; 肝毒性

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-0817-03

Experimental research on triptolide solid lipid nanoparticle for decreasing liver toxicity of triptolide

MEI Zhi-nan, YANG Ya-jiang, XU Hui-bi, YANG Xiang-liang

(Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: **Object** To study the mechanism of triptolide solid lipid nanoparticle (TP-SLN) for decreasing liver toxicity of triptolide (TP). **Methods** With ig three doses of TP-SLN to mice for 60 d, the ALT, AST activities in serum and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and malondialdehyde (MDA) contents in liver were determined. **Results** The activities of ALT, AST, SOD, GSH-Px and content of MDA between experimental group and blank group did not have remarkable difference. However, the activities of ALT, AST, SOD, GSH-Px for the middle- (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and high-dose (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) group were higher and the contents of MDA were lower than the experimental group. **Conclusion** TP-SLN can decrease the liver toxicity of TP.

Key words: triptolide solid lipid nanoparticle (TP-SLN); triptolide (TP); liver toxicity

雷公藤为卫矛科雷公藤属雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.、昆明山海棠 *T. hypoglaucom* (Levl.) Hutch. 以及苍山雷公藤 *T. forrestii* Dials、东北雷公藤 *T. regelli* Sprague et Takeda 等的根、叶、花。由于其生理活性强, 具有显著的抗炎、抗肿瘤^[1]、抗生育^[2]及免疫抑制作用^[3], 临床上应用广泛。据不完全统计, 雷公藤已用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮、过敏性紫癜、皮肤病、肾脏疾病等 50 多种疾病, 外用还有镇痛作用。但其不良反应很多, 主要发生在消化系统、泌尿系统、生殖系统、心血管系统、骨髓及血液系统。还可以引起水肿、血糖升高、复视等, 因此限制了该药在临床上的应用^[4]。研究表明, 雷公藤的药理活性及毒性来源于其复杂的化学成分及生理活性成分, 主要含有生物

碱(如雷公藤碱戊)、二萜类(如雷公藤内酯醇, 即雷公藤甲素、雷公藤乙素)、五环三萜类(如雷公藤内酯甲)、倍半萜类、脂肪油、挥发油、蒽醌类、木脂素类、卫矛醇、鞣质等。其中二萜类和生物碱类是主要活性成分。为了提高雷公藤的药效, 降低其毒性, 本实验以雷公藤内酯醇 (TP) 为模型药物, 研制了雷公藤内酯醇固体脂质纳米粒 (TP-SLN), 探讨其对肝脏的毒性作用。

1 材料

1.1 药品: TP 为福建省医学科学院提供, 含量为 99.98%, 用时配成所需浓度溶液; TP-SLN 为本所研制; ALT, AST, SOD, GSH-Px 及 MDA 等试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 动物: 雄性昆明种小鼠, 体重 (20 \pm 2) g, 由湖

收稿日期: 2002-11-31

基金项目: "十五"国家科技攻关项目 (2001BA310A)

作者简介: 梅之南 (1970—), 男, 博士生, 讲师, 1997 年毕业于中国药科大学, 获硕士学位, 先后工作于武汉大学、中南民族大学, 主要从事药物的研究和开发。Tel: (027) 87543532 E-mail: gly1971@263.net

* 通讯作者

北省预防医学科学研究所实验动物中心提供。

2 方法

2.1 分组及处理: 雄性昆明种小鼠 70 只, 每组 10 只, 随机分为: 对照组, 每天 ig 生理盐水; TP 低、中、高 3 个剂量组, 分别 ig 10, 20, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每天给药 1 次; TP-SLN 组给药方法、剂量同 TP 组。连续 ig 60 d, 自由进食和饮水, 末日隔夜禁食不禁水, 次日晨眼眶取血后处死小鼠, 分离血清测定 ALT, AST, 并取所需器官进行各项测定。

2.2 ALT, AST 的测定: 采用赖氏法测定, 按试剂盒说明书操作方法测定。

2.3 SOD 活性的测定^[5]: 用黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应体系产生的超氧阴离子自由基氧化羟胺形成亚硝酸盐, 检测亚硝酸盐的量计算 SOD 活性, 按试剂盒说明书操作方法测定。以每毫克肝脏蛋白质在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个亚硝酸盐单位, 单位为 NU/mg。用考马斯亮蓝法平行测定相应小鼠肝脏中蛋白质含量。

2.4 GSH-Px 活性测定^[5,6]: 以催化 GSH 的反应速率来表示酶活性。取肝脏匀浆液 0.2 mL, 按试剂盒说明书操作方法测定。规定每毫克肝脏蛋白质, 扣除每分钟非酶促反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 为 1 个酶活力单位 (U), 单位为 U/mg。考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

2.5 MDA 的含量测定^[7]: 取肝脏匀浆液 0.1 mL, 分别加入 3 mL 15% TCA 和 1 mL 6.7% TBA, 于沸水浴中显色 15 min, 冷却后离心, 于 532 nm 处测

上清液吸光度 (A) 值。另用考马斯亮蓝法平行测定相应小鼠肝脏匀浆液中的蛋白质含量。

2.6 数据处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间用 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 TP-SLN 对肝功能的影响: 结果见表 1。ALT, AST 均属非特异性细胞内功能酶, 正常时血清含量很低; 当肝细胞受损, 肝细胞膜通透性增加时, 其活性迅速增强。低剂量 TP-SLN 组和 TP 组对肝脏无明显的损伤作用。TP-SLN 能显著降低 TP 对肝脏的毒性损伤, 同 TP 组相比差异有显著性。

表 1 TP-SLN 对血清 ALT, AST 活性的影响

Table 1 TP-SLN effect on activities of ALT, AST in mice serum

| 组别 | 动物 /只 | 剂量 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | ALT /($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) | AST /($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|--------|----------|---|---|---|
| 对照 | 10 | - | 17.4 \pm 3.92 | 26.9 \pm 2.32 |
| TP | 10 | 10 | 19.3 \pm 4.58 | 30.4 \pm 3.90 |
| | 9 | 20 | 88.8 \pm 9.43** | 110.5 \pm 9.03** |
| | 7 | 30 | 109.9 \pm 10.39** | 132.7 \pm 13.98** |
| TP-SLN | 10 | 10 | 18.9 \pm 4.73 | 28.5 \pm 4.52 |
| | 10 | 20 | 20.7 \pm 5.48 | 30.7 \pm 3.36 |
| | 9 | 30 | 21.3 \pm 6.24 | 32.1 \pm 7.00 |

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.2 TP-SLN 对 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响: 结果见表 2。低剂量 TP 对 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量变化无明显影响, 而中、高剂量雷公藤内酯醇不同制剂, 二者差异存在显著性, TP 组中 SOD, GSH-Px 活性明显低于 TP-SLN 组, 而 MDA 含量则高于 TP-SLN 组。

表 2 TP-SLN 对肝组织 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响

Table 2 TP-SLN effect on activities of SOD, GSH-Px and contents of MDA in liver tissue

| 组别 | 动物/只 | 剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | SOD/($\text{NU} \cdot \text{mg}^{-1}$) | GSH-Px/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) | MDA/($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$) |
|--------|------|---|--|--|--|
| 对照 | 10 | - | 75.00 \pm 5.64 | 67.40 \pm 5.32 | 6.85 \pm 0.54 |
| TP | 10 | 10 | 70.50 \pm 8.49 | 60.32 \pm 10.54 | 7.44 \pm 0.38 |
| | 9 | 20 | 46.42 \pm 7.00** | 36.87 \pm 4.77** | 10.39 \pm 0.97** |
| | 7 | 30 | 35.26 \pm 9.27** | 31.35 \pm 9.49** | 13.31 \pm 1.02** |
| TP-SLN | 10 | 10 | 70.42 \pm 9.69 | 66.75 \pm 7.95 | 7.27 \pm 0.49 |
| | 10 | 20 | 68.77 \pm 7.57 | 57.24 \pm 9.02 | 7.79 \pm 0.78 |
| | 9 | 30 | 65.22 \pm 10.03 | 59.02 \pm 8.12 | 8.10 \pm 1.38 |

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

雷公藤提取物及其二萜内酯类、生物碱具有明显的药理活性, 同时还有明显的毒性。目前, 临床使用的雷公藤主要用其抗炎和免疫抑制活性, 该类制剂在治疗类风湿性关节炎和红斑狼疮等自身免疫性疾病的疗效是非常肯定的, 但也存在明显的不良反应。本研究从降低 TP 肝毒性的角度出发, 将纳米技

术应用到中药领域。初步结果表明, TP-SLN 提高药物疗效的同时能显著降低 TP 对肝脏的损伤。

在实验过程中, TP 组有 4 只(中剂量组 1 只, 高剂量组 3 只), TP-SLN 高剂量 1 只小鼠死亡。尸检发现。肾脏病变较肝脏明显, 除肾小管上皮细胞变性、坏死外, 肾小管管腔内出现蛋白管型。说明 TP 对小鼠的肾损害可能是亚慢性中毒者的主要死亡原

因之一^[8]。因此在临床使用时必须严格掌握用药的剂量。有关 TP-SLN 对肾及其他组织的毒性尚在进一步的研究中。

药物通过多种途径进入机体后在不同水平上引发各种各样的毒性效应。其中许多毒性同自由基与氧化损伤有关。生理条件下,体内自由基的产生和清除存在着动态平衡;但在某些病理条件下,自由基生成过多,超过清除的能力时就会造成组织损伤。本研究表明,固体脂质纳米粒能减少 TP 在小鼠体内 MDA 的产生,说明固体脂质纳米粒可减少 TP 在小鼠体内脂质过氧化反应的发生^[5-7,9]。这应与 TP-SLN 对小鼠体内 SOD 和 GSH-Px 活性影响较小有关。

References:

[1] Gao X P, Li B G, Zhou J, *et al.* Antitumor activities and induction of apoptosis by triptolide [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(1): 18-21.
 [2] Huynh P N, Hikim A P, Wang C, *et al.* Long-term effects of triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function, and fertility in male rats [J]. *J Androl*, 2000, 21(5): 689-699.

[3] Chan E W, Cheng S C, Sin F W, *et al.* Triptolide induced cytotoxic effects on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 122(1): 81-87.
 [4] Su X, Zhang S M, Tian C H, *et al.* Safety of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2001, 10(7): 539-543.
 [5] Weiss C, Maker H S, Lehrer G M. Sensitive fluorometric assays for glutathione peroxidase and reductase [J]. *Anal Biochem*, 1980, 106: 512-516.
 [6] Beyer W F, Fridovich I. Phosphate, not superoxide dismutase, facilitates electron transfer from ferrous salts to cytochrome C [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 285(1): 60-63.
 [7] Nebot C, Moutet M, Huet P, *et al.* Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol [J]. *Anal Biochem*, 1993, 14(4): 442-451.
 [8] Liu L, Wang Z Y, Huang G Z, *et al.* The influence of triptolide sub-chronic intoxication on kidney and testicle in mice [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 2001, 30(3): 214-217.
 [9] Ray S D, Fariss M W. Role of cellular energy status in tocopherol hemisuccinate cytoprotection against ethyl methane-sulfonate-induced toxicity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 311(3): 180-190.

四逆汤对高钾和去氧肾上腺素收缩主动脉环效应的影响

邵春红, 王晓良*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所 药理室, 北京 100050)

摘要: 目的 研究四逆汤对高钾和去氧肾上腺素 (Phe) 收缩大鼠离体主动脉血管环效应的影响。方法 观察四逆汤在主动脉环上拮抗 KCl (60 mmol/L) 和 Phe ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$ mmol/L) 的收缩血管作用, 分别用普萘洛尔 (Pro, 3×10^{-6} mmol/L) 和 Bay K8644 (BK, 1×10^{-5} mmol/L) 干预探讨其机制。结果 四逆汤减弱累积浓度的 Phe 收缩血管的效应, 最大值 (T_{max}) 减小, Pro 不影响四逆汤的拮抗作用; 四逆汤减小高钾刺激血管的最大收缩效应, BK 不能恢复这种效应。结论 四逆汤使 Phe 的量效曲线右移, 并减小其最大效应值, 表现为非竞争性拮抗作用; 减小高钾收缩血管的作用, Ca^{2+} 开放剂 BK 不能恢复四逆汤的抑制作用。四逆汤能阻断 α_1 受体, 其减弱高钾刺激引起的血管收缩可能和钙通道无关。

关键词: 四逆汤; 去氧肾上腺素; 普萘洛尔; Bay K8644

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-0819-03

Effect of SINI TANG* on contraction of aortic rings induced by high K^+ and phenylephrine

SHAO Chun-hong, WANG Xiao-liang

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Object** To study the effects of SINI TANG (SNT) on the rat aortic rings pre-contracted by high K^+ and phenylephrine (Phe). **Methods** The effects of SNT on the aortic rings in the presence of 60 mmol/L KCl and Phe ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$ mmol/L) were observed and their mechanisms were studied after treatment with Propranolol (Pro, 3×10^{-6} mmol/L) and Bay K8644 (BK, 1×10^{-5} mmol/L) as tool drugs. **Results** SNT inhibited the contraction induced by cumulative Phe and decreased the maximum tension (T_{max}); Pro couldn't influence the effects of SNT. SNT attenuated the amplitude of contractile effect

* 收稿日期: 2002-12-28

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7011002)

作者简介: 邵春红 (1972—), 女, 浙江人, 博士后, 研究方向为心血管药理学。