

注射用甘草酸纳米无菌粉对大鼠慢性肝损伤的影响

黄 岩^{1,2}, 祖元刚^{1,2*}, 张 琳^{1,2}, 赵修华^{1,2}, 赵 野^{1,2}, 曹 珊^{1,2}

1. 东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学 林业生物制剂教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 探讨注射用甘草酸纳米无菌粉对 CCl_4 所致大鼠慢性肝损伤的影响。**方法** 采用超临界反溶剂法制备甘草酸纳米粒, 高压蒸气灭菌后制备注射用甘草酸纳米无菌粉; 40 只大鼠随机分为 4 组 (每组 10 只), 分别为甘草酸单铵组、甘草酸纳米粉组、模型组、对照组; 除对照组外, 其他 3 组大鼠 ig 50% CCl_4 -大豆油溶液 8 周以制备慢性肝损伤模型, 随后甘草酸单铵组、甘草酸纳米粉组分别 iv 相应药物 $1.71 \times 10^{-5} \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 连续 4 周; 测定大鼠肝脏指数, 血清中碱性磷酸酶 (ALP)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性, 肝组织匀浆液中羟脯氨酸 (Hyp)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平和铜锌超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD) 的活性, HE 染色、光镜观察肝脏病理变化。**结果** 与甘草酸单铵组相比, 甘草酸纳米无菌粉组血清中 ALP、ALT、AST 活性分别降低 29.68%、5.51%、3.97%; 肝脏指数降低 3.42%, 肝组织 Hyp 降低 15.67%、SOD 升高 15.70%、GSH-Px 升高 6.56%。病理学检查结果可见, 甘草酸纳米无菌粉组肝组织变性明显减轻, 肝组织病变过程得到缓解。**结论** 经过粒径改造的甘草酸纳米粉注射液对 CCl_4 所致大鼠慢性肝损伤有更好的治疗作用。

关键词: 甘草酸; 纳米无菌粉; 超临界反溶剂法; 慢性肝损伤; CCl_4

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)10-2060-05

Effects of sterile glycyrrhizic acid nanoparticles for injection on chronic liver injury in rats

HUANG Yan^{1,2}, ZU Yuan-gang^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2}, ZHAO Xiu-hua^{1,2}, ZHAO Ye^{1,2}, CAO Shan^{1,2}

1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. Engineering Research Center of Forest Bio-preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Key words: glycyrrhizic acid; sterile nanoparticles; supercritical anti-solvent process; chronic liver injury; CCl_4

甘草酸是甘草的主要活性成分之一, 具有抗溃疡、抗病毒、抗癌等作用^[1-3], 特别是保肝、治疗肝脏疾病的特点^[4], 可使其用于以抵抗由药物等引起的急性肝毒性^[5], 治疗肝纤维化、肝硬化等晚期肝疾病。甘草酸在水中溶解度低, 吸收缓慢, 在一定程度上限制了其应用。药物粒径改造可有效提高其溶解性, 在特定粒径范围内的药物 iv 后被单核-吞噬细胞系统所吸收, 主要分布在肝、脾, 使其具有较好的被动肝靶向性^[6]。本实验观察超临界反溶剂法联合高压蒸气灭菌法制备的甘草酸纳米无菌粉对 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤模型的治疗作用, 并与甘草酸注射液中的主要有效成分甘草酸单铵进行比较,

为纳米药物的应用提供借鉴与参考, 为甘草酸纳米制剂的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

甘草酸 (质量分数为 98%), 甘草酸单铵 (质量分数为 98.8%), 均为中国江苏天晟药业公司。碱性磷酸酶 (ALP)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、羟脯氨酸 (Hyp)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、铜锌超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD) 检测用试剂盒, 南京建成生物工程公司产品; CCl_4 , 分析纯, 中国天津进丰化工公司; 大豆油, 超纯水。

收稿日期: 2011-03-07

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD18B04); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (DL09BA21)

作者简介: 黄 岩 (1987—), 男, 河南省南阳市人, 硕士研究生, 研究方向为植物化学与植物药。E-mail: hyrocky@163.com

*通讯作者 祖元刚 E-mail: zygorl@163.com

1.2 仪器

超临界二氧化碳反溶剂纳米粉体制备装置, 由本实验室自行研制^[7]; GF—D300 型半自动生化分析仪, 山东彩虹高密分析仪器有限公司产品; Millipore 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; LDZX—40BI 自动电热压力蒸气灭菌器, 上海申安医疗器械厂生产; Zetasizer—3000HS 激光粒度仪, 英国 Malvern 公司产品; MX2600FE 扫描电子显微镜, 英国 Camscan 公司产品。

1.3 动物

Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 (200±20) g, 由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (黑) 2006-008。

2 方法

2.1 注射用甘草酸纳米无菌粉的制备

根据本实验室前期实验研究结果^[8], 超临界二氧化碳反溶剂法制备甘草酸纳米粒的最佳制备过程: 将甘草酸溶于无水乙醇中配制成 10 mg/mL 溶液, 在压力 20 MPa、温度 90 °C、CO₂ 流量为 10.6 kg/h、甘草酸乙醇溶液体积流量为 20 mL/min 条件下, 采用超临界 CO₂ 抗溶剂微纳米粉体制备装置制备^[9], 得到甘草酸纳米粒, 高压蒸气灭菌后封装备用。在使用前, 将甘草酸纳米粒按 5 mg/mL 的质量浓度溶解于超纯水中, 0.45 μm 滤膜滤过, 直接用于注射。

2.2 分组、造模与给药

40 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为甘草酸单铵组、甘草酸纳米无菌粉注射液 (简称甘草酸纳米粉) 组、模型组、对照组。除对照组外, 其余各组 ig 50% CCl₄-大豆油溶液 1 mL/kg, 每周 2 次, 持续 8 周, 制备慢性肝损伤大鼠模型。随后给药组 iv 给予相应药物 1.71×10^{-5} mol/(kg·d), 连续 4 周, 对照组和模型组给以相同剂量的注射用去离子水。末次给药后 24 h, 采集血清及肝脏标本待测。

2.3 检测指标

按试剂盒说明书检测血清 ALP、ALT、AST 活性。处死大鼠, 迅速剥离肝脏, 冰冷生理盐水迅速漂洗以除去血液, 滤纸拭干。称肝脏质量, 计算肝脏指数 (肝脏指数=肝质量/大鼠质量); 切取肝左叶 0.2~1.0 g, 制备一定浓度的肝组织匀浆液, 按试剂盒说明书测定 Hyp、GSH-Px 水平、CuZn-SOD 活性。

2.4 肝组织病理学观察

大鼠肝右叶常规切片, HE 染色, 显微镜下 (×400) 观察组织病理学。并按照以下标准^[10]进行评分: 1 分 (-): 肝小叶结构完整, 肝细胞整齐, 无异常; 2 分 (+): 肝细胞局限性变性、轻微纤维化、灶状坏死, 有少量炎细胞浸润; 3 分 (++) : 肝细胞弥漫性变性、坏死、纤维化、局限性坏死, 肝小叶结构改变, 有较多炎细胞浸润。4 分 (+++) : 肝细胞弥漫性变性、坏死、纤维化较重, 肝小叶结构严重破坏, 大量炎细胞浸润。

2.5 数据处理

所有数据以 SPSS V17.0 软件进行统计分析, 包括方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 甘草酸纳米粉收率与粒径

本实验制备得到的甘草酸纳米粉收率为 89.2%, 经激光粒度仪测定其平均粒径为 (100±30) nm。由扫描电镜图像 (图 1) 可进一步验证其粒径范围。

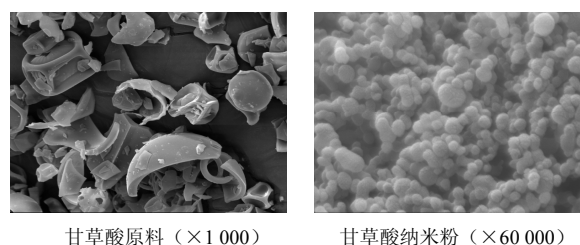


图 1 甘草酸原料和甘草酸纳米粉的扫描电镜图像

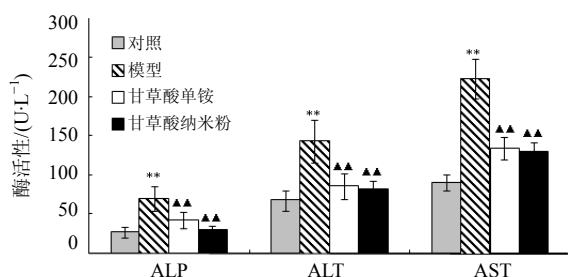
Fig. 1 SEM images of glycyrrhizic acid and glycyrrhizic acid nanoparticles

3.2 对慢性肝损伤大鼠血清 ALP、ALT、AST 活性的影响

与对照组相比, 模型组 ALP、ALT、AST 活性显著升高 ($P<0.01$), 表明造模成功; 与模型组相比, 甘草酸单铵组和甘草酸纳米粉组 ALP、ALT、AST 活性均显著降低 ($P<0.01$); 与甘草酸单铵组相比, 甘草酸纳米粉组 ALP、ALT、AST 活性分别降低 29.68%、5.15%、3.97%, 表明甘草酸纳米粉的效果优于甘草酸单铵。结果见图 2。

3.3 对慢性肝损伤大鼠肝脏指数的影响

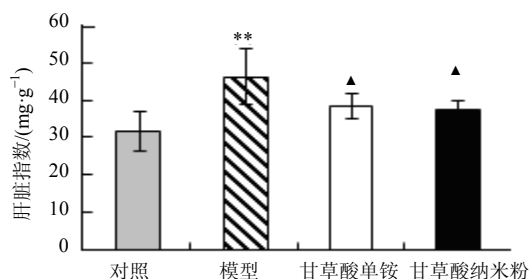
与对照组相比, 模型组大鼠肝脏指数显著升高 ($P<0.01$)。与模型组相比, 甘草酸单铵组与甘草酸纳米粉组肝脏指数均显著降低 ($P<0.05$)。与甘草酸单铵组相比, 甘草酸纳米粉组肝脏指数降低了 3.42%。结果见图 3。



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ▲ $P<0.01$
 ** $P<0.01$ vs control group; ▲ $P<0.01$ vs model group

图2 甘草酸纳米粉对慢性肝损伤大鼠血清 ALP、ALT、AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of glycyrrhizic acid nanoparticles on activities of ALP, ALT, and AST in serum of chronic liver injury rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)



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

图3 甘草酸纳米粉对慢性肝损伤大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effects of glycyrrhizic acid nanoparticles on liver index of chronic liver injury rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.4 对慢性肝损伤大鼠肝组织 Hyp、GSH-Px 水平及 SOD 活性的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肝组织中 SOD 活

性、GSH-Px 水平显著降低 ($P<0.01$), Hyp 水平显著升高 ($P<0.01$), 表明模型制备成功。与模型组相比, 甘草酸单铵组与甘草酸纳米粉组大鼠肝组织中 SOD 活性和 GSH-Px 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 而 Hyp 水平显著降低 ($P<0.01$)。与甘草酸单铵组相比, 甘草酸纳米粉组 SOD 活性提高 15.70%, GSH-Px 水平提高 6.56%, Hyp 水平降低 15.67%, 表明甘草酸纳米粉的效果优于甘草酸单铵。结果见图 4。

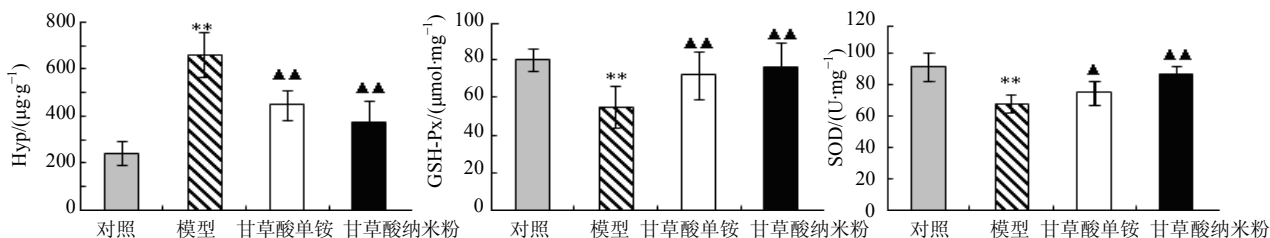
3.5 对慢性肝损伤大鼠肝组织病理学的影响

HE 染色结果显示, 对照组肝细胞排列较规则, 未见脂肪变性、水肿、坏死及纤维增生。模型组肝组织正常结构被破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞水肿, 部分呈现气球样变, 纤维组织大量增生, 分割肝小叶。甘草酸单铵组与甘草酸纳米粉组肝细胞坏死区域、纤维增生减少, 细胞轻度肿胀; 其中甘草酸单铵组肝细胞弥漫性变性, 有大量炎细胞浸润; 甘草酸纳米粉组肝组织轻微纤维化, 有少量炎细胞浸润, 多数细胞结构较正常, 部分接近正常细胞。表明甘草酸纳米粉作用强于甘草酸单铵。结果见表 1 及图 5。

4 讨论

ALP 主要由骨细胞分解得到, 随后经过肝脏、胆道排出体外。若肝胆发生病变, ALP 不能及时排出, 导致其回流入血液中, 致使血清中检测的 ALP 值偏高。肝纤维化由慢性肝炎发展而来, 并与异常的细胞外基质蛋白, 尤其是胶原的积累有关。Hyp 是胶原的主要成分, 其量可用来评估胶原的量, 因而可用来反映肝纤维化的程度, Hyp 的量越高, 表明肝损伤程度越重。

由 CCl₄ 导致的肝毒性, 其机制在于 CCl₄ 产生



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

图4 甘草酸纳米粉对慢性肝损伤大鼠肝组织 Hyp 和 GSH-Px 的量、SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 4 Effects of glycyrrhizic acid nanoparticles on Hyp, GSH-Px levels, and SOD activity in liver tissue of chronic liver injury rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

表1 大鼠慢性肝损伤病理评分 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Pathological grading of chronic liver injury in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	评分
对照	10	—
模型	8	3.25±0.71**
甘草酸纳米粉	9	1.78±0.44▲▲
甘草酸单铵	8	2.25±0.38▲▲

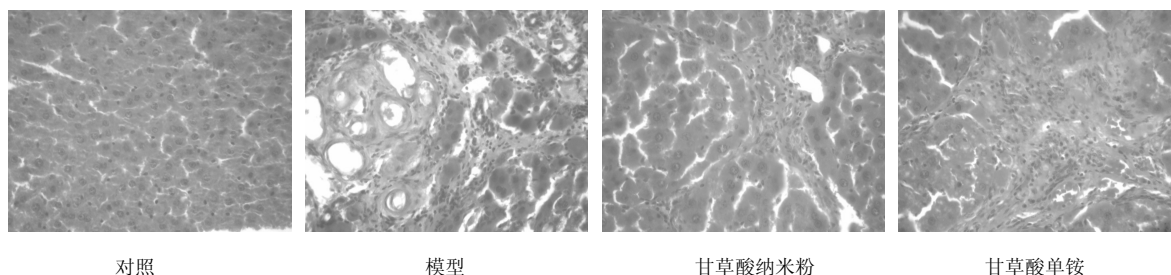
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲▲ $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

图5 慢性肝损伤大鼠肝脏病理学观察

Fig. 5 Liver pathologic image of chronic liver injury in rats

的甘草酸注射剂型以甘草酸单铵及甘草酸二铵为主要有效成分,改善了溶解性,但屡有不良反应及安全性问题的报道,影响肝、肾功能,引起钠水潴留、肝性腹水等症状^[11-13]。药物粒径改造可有效地解决甘草酸的溶解性的问题,通过纳米化过程,可以增加药物的相对表面积,提高生物利用度,增强靶向性^[14]。本实验结果表明,注射用甘草酸纳米无菌粉对 CCl_4 导致的大鼠慢性肝毒性的治疗效果优于现有注射剂中的主要有效成分甘草酸单铵,原因可能为:直径 10~1 000 nm 的纳米球经 iv 给药后,主要被单核-巨噬细胞系统摄取,而该系统的分布具有特异性,导致纳米球主要分布于肝 (60%~90%),其次分布于脾 (2%~10%)、肺 (3%~10%) 中,少量进入骨髓^[6],因此经过粒径改造的甘草酸 [直径 (100±30) nm] 被单核-吞噬细胞系统摄取,被定向作用于肝脏,改善了原有的治疗效果。

2005 年美国 FDA 批准了纳米注射新药 Abraxane[®] (直径 130 nm) 上市^[15],开创了纳米药物实际应用的先河。与传统方法相比,超临界反溶剂法制备甘草酸纳米粒具有产物粒径小、分布均匀、水溶性好,且制备过程对环境友好等优点,有望成为纳米制药的常用方法之一。

活性氧自由基的生物效应。当肝脏处于过量的碳中心三氯甲基毒性环境中时,黄嘌呤氧化酶的活性随着细胞损伤的发展而升高,而该酶可产生致肝毒性的超氧负离子和过氧化氢,这些活性氧簇 (ROS) 量的增加导致负责清除这些物质的抗氧化酶如 SOD、GSH-P_x 减少,而这些酶的减少程度也反映了肝脏受损的程度。

注射剂由于没有首关效应,且具有较高的生物利用度,已逐渐成为常用给药方式。甘草酸水溶性较差,吸收缓慢,一定程度上影响了其应用。现有

参考文献

- [1] Isbrucker R A, Burdock G A. Risk and safety assessment on the consumption of *Licorice* root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin [J]. *Regu Toxicol Pharmacol*, 2006, 46(3): 167-192.
- [2] 段伟奇, 姬胜利. 甘草酸抗病毒活性的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 附 1-附 3.
- [3] 陈建新, 邱灵才, 方炳虎, 等. 甘草酸单铵盐对 H_9N_2 禽流感病毒的作用机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 896-899.
- [4] Wan X Y, Luo M, Li X D, et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 181(1): 15-19.
- [5] Lee C H, Park S W, Kim Y S. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by barbon tetrachloride in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(10): 1898-1904.
- [6] 陆 彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [7] 祖元刚, 祖柏实, 赵修华, 等. 一种水溶性纳米材料超临界二氧化碳抗溶剂制备装置 [P]. 中国: CN200810064220, 2008-09-17.

- [8] 卫蔚. 甘草酸超细微粒的超临界反溶剂法制备及其药用活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [9] 祖元刚, 赵修华, 祖柏实, 等. 一种水溶性纳米化甘草酸粉体的超临界反溶剂制备方法 [P]. 中国: CN101756905A, 2010-06-30.
- [10] 王勤, 肖刚. 罗汉果甜苷对大鼠慢性肝损伤保护作用实验研究 [J]. 广西中医药, 2007, 30(5): 54-56.
- [11] 徐会选. 甘草酸类药物的不良反应 [J]. 药物不良反应杂志, 2003, 5(3): 166-171.
- [12] 于占水, 桑玉香. 甘草酸单铵致钠水潴留1例报告 [J]. 药物流行病杂志, 2001, 10(1): 52.
- [13] 卢炜, 李芳. 静滴强力宁注射液诱发肝性腹水7例报告 [J]. 滨州医学院学报, 2002, 25(2): 153.
- [14] 张晓静. 中药纳米化的作用及存在的问题 [J]. 江苏中医药, 2003, 24(3): 40-44.
- [15] Wong J, Brugger A, Khare A, *et al.* Suspensions for intravenous (iv) injection: A review of development, preclinical and clinical aspects [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(8): 939-954.

欢迎订阅 2012 年《中国新药杂志》

《中国新药杂志》创刊于1992年,是由国家食品药品监督管理局主管,中国医药科技出版社、中国医药集团总公司和中国药学会共同主办的国家级药学核心期刊,主编为全国人大常委会副委员长桑国卫院士,编委会成员包括我国医药界18名院士在内的147名药学领军专家。是中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、全国中文核心期刊、中国精品科技期刊、中国期刊方阵‘双效’期刊。

本刊跟踪世界新药研发前沿,报道我国新药注册信息和审评技术,刊登最新临床试验研究成果,介绍近1~2年世界上市新药,登载药物经济学、药理学、毒理学、药物化学、药剂学、药物分析、生物化学、微生物学、分子生物学及其相关学科的原创研究论文和综述。本刊兼具权威性、前沿性、学术性、创新性、时效性、实用性的特点,深受广大医药工作者喜爱,读者已经遍布33个国家和地区。《中国新药杂志》是我国药学领域高水平学术期刊,在医院、高等院校、研发机构、制药企业、药检部门等拥有广泛的读者,年发行量30万册。现已被美国《化学文摘(CA)》、荷兰《医学文摘(EmBase)》、《国际药学文摘(IPA)》、《中国药学文摘》、中国学术期刊综合评价数据库等多家国内外权威检索数据库收录。

《中国新药杂志》为半月刊,每月15日和30日出版,国内外公开发行。国外定价:12美元/期,全年288美元;国内定价:30元/期,全年720元。国际连续出版物号ISSN:1003-3734,国外代号:M4240,国内统一刊号CN11-2850/R,邮发代号:82-488。

邮局汇款: 北京市西城区北三环中路乙6号伦洋大厦8层 邮编:100120

全称: 《中国新药杂志》有限公司

银行汇款: 建行北京科技馆支行账号:1100 1059 1000 5926 1092

全称: 《中国新药杂志》有限公司

电话: 010-82282303, 010-82282289 (传真) 联系人: 达娃卓玛

网址: <http://www.newdrug.cn> E-mail: xyzz711@sohu.com