

W3D 固体分散体的制备及其抗对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤的保护作用

孟莎¹, 史新阳¹, 葛睿¹, 唐莉^{1*}, 李青山^{1,2*}(1.山西医科大学药学院, 太原 030001; 2.山西中医药大学, 基于炎症反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室, 太原 030024)

摘要: 目的 将 4-(5'-二甲氨基)-萘磺酰氧基苯并噁唑酮(W3D)制成固体分散体, 并研究其对对乙酰氨基酚(*N*-acetyl-para-aminophenol, APAP)诱导的急性肝损伤(acute liver injury, ALI)的保护作用。方法 采用溶剂法将原料药 W3D 及辅料 PVP K30 按 1 : 7 反应得 W3D 固体分散体。采用差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)和 X-粉末射线衍射(X-ray diffraction, XRD)手段表征固体分散体的物相变化, 同时对其饱和溶解度、溶出重现性进行考察。建立对乙酰氨基酚诱导的 ALI 模型, 分别灌胃给予阳性药 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC, 12.5 mg·kg⁻¹)、W3D 原料药(12.5 mg·kg⁻¹)、W3D 固体分散体(12.5, 6.25 和 3.125 mg·kg⁻¹), 24 h 后处死小鼠, 取出肝脏, 计算肝脏指数; HE 染色观察肝组织病理变化, 微孔板法检测血清中 ALT、AST 的含量及肝组织中 SOD 活力、微量 GSH 含量, TBA 法检测 MDA 的含量, ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-6 的含量, 免疫组化检测肝组织 MD2 蛋白的表达。结果 W3D 固体分散体为无定形形态, 10 min 的溶出度即可达 70%; W3D 可降低 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝脏指数, 减少肝组织血管周围细胞核固缩、碎裂或溶解等现象, 剂量依赖性地减少血清中 ALT、AST、TNF- α 、IL-6 的含量, 升高肝组织中 GSH 含量及 SOD 活力, 降低 MDA 含量而呈现出优于临床用药 NAC 的肝保护活性; W3D 亦可降低 ALI 小鼠肝组织中 MD2 蛋白的含量。结论 W3D 固体分散体可通过抑制氧化应激和炎症而发挥抗 APAP 诱导的 ALI 作用, 其作用机制可能与降低 MD2 蛋白表达有关。

关键词: 4-(5'-二甲氨基)-萘磺酰氧基苯并噁唑酮; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤; 炎症因子; MD2

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)24-3204-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.24.003

引用本文: 孟莎, 史新阳, 葛睿, 等. W3D 固体分散体的制备及其抗对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(24): 3204-3210.

Preparation of W3D Solid Dispersion and Its Protective Effect Against Activity on Acute Liver Injury Induced by *N*-Acetyl-para-aminophenol

MENG Sha¹, SHI Xinyang¹, GE Rui¹, TANG Li^{1*}, LI Qingshan^{1,2*}(1.School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2.Shanxi Key Laboratory of Innovative Drug for the Treatment of Serious Diseases Basing on the Chronic Inflammation, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare 4-(5'-dimethylamino)-naphthalenesulfonyl-2(3H)-benzoxazolone(W3D) as solid dispersion to investigate its protective effect on *N*-acetyl-para-aminophenol(APAP) induced acute liver injury(ALI). **METHODS** The solid dispersion of W3D was prepared by the reaction of W3D and PVP K30 at a ratio of 1 : 7 using solvent method. Differential scanning calorimetry(DSC) and X-ray diffraction(XRD) analysis were used to characterize the phase change of the solid dispersion. The saturation solubility and dissolution reproducibility were also determined. After APAP induced ALI model mice established, the mice were administered intragastrically with *N*-acetyl-L-cysteine(NAC), W3D(12.5 mg·kg⁻¹), W3D solid dispersion (12.5, 6.25 and 3.125 mg·kg⁻¹). Twenty-four hours later, the liver tissues were collected to calculate the liver index, and the pathological changes were evaluated by HE staining. The expression of ALT and AST in serum, SOD activity and GSH in liver tissue were detected by microporosity plate, MDA content was detected by TBA method, TNF- α and IL-6 contents in serum were detected by ELISA, and the expression of MD2 protein in liver tissue was detected by immunohistochemistry. **RESULTS** The W3D solid dispersion was amorphous and the dissolution rate was >70% in 10 min. W3D could decrease the liver index, reduce the phenomenon of nucleus pycnosis, fragmentation and dissolution compared with APAP treated group. The levels of ALT, AST, TNF- α and IL-6 in serum were decreased dose-dependently, and the activities of GSH and SOD in liver tissue were increased in W3D treat groups. On the contrary, W3D could reduce the production of MDA significantly, which was better than

基金项目: 国家自然科学基金项目(81602976); 山西省应用基础研究计划项目(201901D211350); 山西省回国留学人员重点科研项目(2014-重点 2)

作者简介: 孟莎, 女, 硕士生 E-mail: mengs0320@163.com *通信作者: 唐莉, 女, 博士, 副教授, 硕士 E-mail: tangli70201@163.com
李青山, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: sxlqs@163.com

NAC. Meanwhile, the expressions of MD2 protein in liver tissues were also decreased after the treatment of W3D. **CONCLUSION** W3D solid dispersion can protect APAP-induced ALI by regulate the oxidative stress and inflammation reaction, and the mechanism might be related to the inhibiting effect on MD2 protein.

KEYWORDS: 4-(5'-dimethylamino)-naphthalenesulfonyl-2(3H)-benzoxazolone(W3D); *N*-acetyl-para-aminophenol; acute liver injury; inflammatory factors; MD2

药物性肝损伤作为一个重要的临床问题及世界性健康问题,已引起人们的高度重视。其中非甾体解热镇痛药对乙酰氨基酚(*N*-acetyl-para-aminophenol, APAP)发生药物性肝损伤的概率最高,已经成为欧美等发达国家引起急性肝衰竭的最主要因素^[1]。APAP是一种常用的解热镇痛药,其在治疗剂量下安全,但过量使用可导致急性肝损伤(acute liver injury, ALI),甚至肝功能衰竭,而氧化应激和炎症是 ALI 的重要机制^[2-4]。目前治疗 APAP 诱导肝损伤唯一有效药物是 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC),但其会产生如皮疹、恶心、瘙痒、高热、过敏性休克等不良反应^[5-6]。因此,开发高活低毒用于治疗 APAP 诱导的 ALI 药物成为亟待解决的科学问题。

化合物 4-(5'-二甲氨基)-萘磺酰氧基苯并噻唑酮(W3D)是课题组以氯唑沙宗为骨架,经结构修饰后获得的高抗炎镇痛活性化合物,其在急性肺损伤、关节炎等疾病中均显示出了一定的优势^[7-9],且无明显毒性。基于该化合物的高抗炎活性,笔者猜测其可通过抑制炎症而发挥肝保护作用。考虑到水溶性问题,本研究将 W3D 制成固体分散体,通过建立 APAP 诱导的小鼠 ALI 模型,评价其对肝损伤的保护作用。

1 材料

1.1 试剂

W3D(山西医科大学药学院药物化学教研室提供,批号:20200520;纯度 $\geq 98\%$); APAP(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY91059;纯度:99%); NAC(阿拉丁公司); Rabbit Anti-MD2 抗体(美国 Abcam,批号:ab24182); HRP-羊抗兔 IgG(塞维尔,批号:G1213); 小鼠 TNF- α 、IL-6 试剂盒(武汉博士德生物公司,批号分别为 EK0527, EK0411); ALT、AST、微量 GSH、SOD、MDA 均购自南京建成有限公司,批号分别为 20190930, 20190930, 20190930, 20190930; PVP K30(罗恩试剂,批号:RH189135); 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

702 型超低温冰箱、Model 680 型全波长多功

能酶标仪(Thermo 公司); RM2016 病理切片机(Leica 公司); TSY-B 脱色摇床(塞维尔生物公司); E100 显微镜(Nikon 公司); RCZ-1B 型溶出试验仪(黄海药物测试公司); D8 型 X-粉末射线衍射仪(Swiss Brook 公司); DSC3 型差示扫描量热仪(Mettler); BZF-30 真空干燥箱(上海 Boxun 公司); 恒温磁力搅拌器(IKA 公司); TGL-16 低温冷冻离心机(上海安亭公司, 2 mL \times 24)。

1.3 动物

SPF 级 ICR 小鼠,♂,体质量(25 \pm 2)g,购自山西医科大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(晋)2019-0004。饲养条件:(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,自由进食饮水,动物实验相关处理均符合动物伦理要求。

2 方法

2.1 固体分散体的制备方法

原料药 W3D 及辅料 PVP K30 按 1:7 置于茄形瓶,加入适量甲醇超声溶解,室温下搅拌 2 h,40 $^{\circ}$ C 旋转蒸发除去溶剂,置于 35 $^{\circ}$ C 真空干燥箱干燥 12 h,研磨,过 100 目筛,得 W3D 固体分散体。

2.2 质量评价

2.2.1 HPLC 检测条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相:甲醇-水(75:25); 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 28 $^{\circ}$ C; 于 257 nm 波长下进样 10 μ L 检测吸收峰。

2.2.2 饱和溶解度 取过量的 W3D 原料药、物理混合物(W3D 与 PVP K30 充分混合制得)、固体分散体置于离心管中,加适量水超声配制饱和溶液,10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 3 min 后取上清 1 mL,经 0.22 μ m 有机滤膜过滤后进样 20 μ L 检测,以外标法计算 W3D 含量。

2.2.3 溶出重现性 参照中国药典 2020 年版四部附录通则 0931 中第二法(浆法),溶出介质为 900 mL 脱气纯净水,转速为 75 r \cdot min⁻¹,温度为(37.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C。精密称取 3 批 W3D 固体分散体(含主药 10 mg),分别于 5, 10, 20, 30, 45, 60 min 取样 5 mL,同时补加同体积等温介质,样品经 0.22 μ m 水系滤膜过滤,取续滤液进样 10 μ L 检测,记录峰面积,按外标法计算溶出度,绘制累积溶出

曲线。

2.2.4 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 以空白铝坩埚为参比物, N_2 为保护气, 流速设定为 $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 扫描范围设定为 $25\sim 250 \text{ }^\circ\text{C}$, 升温速度控制在 $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 采用 DSC 分别对 W3D、PVP K30 物理混合物及 W3D 固体分散体进行分析^[10]。

2.2.5 粉末 X-射线衍射 (X-ray diffractometry, XRD)法 $\text{Cu-K}\alpha$ 射线(波长 0.154 nm), 管电压为 30 kV , 扫描范围 $5^\circ\sim 50^\circ$, 扫描速度 $10^\circ\cdot\text{min}^{-1}$, 分别对 W3D、PVP K30 物理混合物及 W3D 固体分散体进行分析^[11]。

2.3 W3D 对 APAP 诱导 ALI 保护作用的研究

2.3.1 动物处理 取 42 只雄性 ICR 小鼠, 随机分为对照组(生理盐水)、模型组(APAP)、阳性药组(NAC $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、W3D 原料药组(W3D $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和固体分散体低、中、高剂量组(W3D 主药含量: $3.125, 6.25, 12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 6 只。单次腹腔注射 APAP($500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 于生理盐水中 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 超声溶解后迅速腹腔注射), 2 h 后分别灌胃给予不同浓度的化合物, 24 h 后放血处死小鼠, 立即取出肝脏, 称重, 取材后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。

2.3.2 小鼠肝脏指数的测定 实验前称取体质量, 处死小鼠后, 迅速取出肝脏, 冷生理盐水洗净, 滤纸吸干水分, 称取肝重。计算: 肝脏指数=(肝质量/体质量) $\times 100\%$ 。

2.3.3 HE 染色观察小鼠肝组织病理变化 取部分肝组织, 置 4% 甲醛溶液中固定 48 h, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察肝组织病理变化^[12]。

2.3.4 微孔板法检测血清中 ALT、AST 的含量 小鼠血液室温放置 1 h, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取上清进行分装, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。参照试剂盒说明书, 检测血清中 ALT、AST 含量。

2.3.5 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-6 的含量 按“2.3.4”项下方法取小鼠血清, 按照试剂盒说明书操作测定小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 的含量。

2.3.6 微孔板法及 TBA 法检测肝组织中 SOD 活力、GSH 及 MDA 的含量 取 0.1 g 肝组织, 加入适量生理盐水, 以玻璃匀浆器制备肝组织匀浆液, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $4500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清。按照试剂盒说明检测肝组织中的 SOD 活力、GSH 及 MDA 含量。

2.3.7 免疫组化检测肝组织 MD2 的表达 将石蜡

切片脱蜡至水, 经抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、孵一抗、孵二抗、DAB 显色、复染、脱水封片后, 显微镜观察, 采集图像并分析。

2.4 统计学方法

所有实验结果均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析组间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。

3 结果

3.1 W3D 固体分散体的质量评价

3.1.1 饱和溶解度 经测定, W3D 原料药水中的饱和溶解度远低于定量下限浓度($0.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 而物理混合物、固体分散体水中的饱和溶解度分别为 $0.23, 54.83 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 化合物制备成固体分散体后水溶性显著增大。

3.1.2 溶出重现性 将 W3D 制成固体分散体后, 10 min 时的溶出度即可达 70%, 且 3 批 W3D 固体分散体溶出重现性良好, 证明上述制备工艺可保障所制备固体分散体的质量均一。结果见图 1。

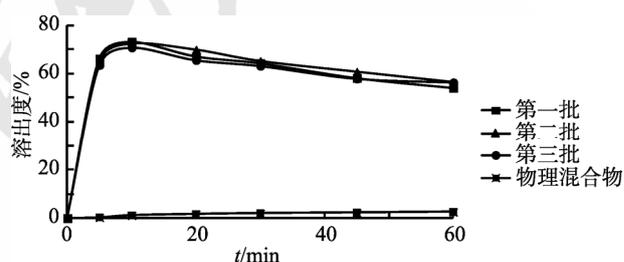


图 1 不同批次 W3D 固体分散体的溶出重现性

Fig. 1 Solubility reproducibility of different batches of W3D solid dispersions

3.1.3 DSC 结果 W3D 原料药在 $185.84 \text{ }^\circ\text{C}$ 处存在显著的吸热峰; 而辅料 PVP K30 以无定形态存在, 未见吸热峰; 物理混合物未见吸热峰, 考虑是化合物与辅料因加热而发生相互作用所致; W3D 固体分散体不存在吸热峰, 其 DSC 曲线与辅料 DSC 曲线相似, 表明药物完全分散于载体中, 并以无定形态存在。结果见图 2。

3.1.4 XRD 结果 W3D 原料药在 $11.65^\circ, 12.39^\circ, 13.39^\circ, 14.07^\circ, 16.87^\circ, 17.52^\circ, 18.95^\circ, 21.31^\circ$ 和 24.26° 等处显示出清晰的衍射峰, 说明 W3D 原料药以晶体形式存在; PVP K30 无特征衍射峰, 为无定形态; 物理混合物在 $12.39^\circ, 17.52^\circ$ 和 21.31° 处存在衍射峰, 说明有少量 W3D 晶体存在; W3D 固体分散体未见衍射峰, 为无定形态。结果见图 3。

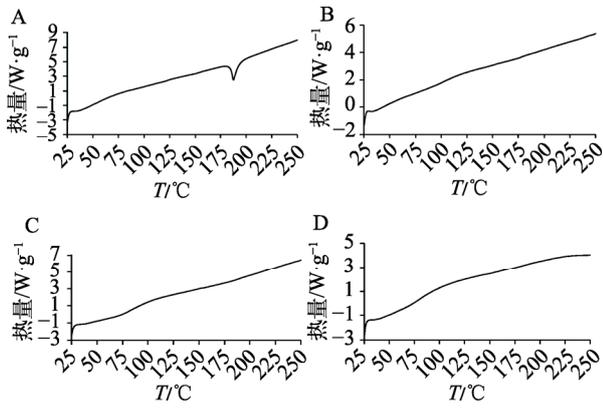


图 2 DSC 曲线
A-W3D 原料药; B-PVP K30; C-物理混合物; D-W3D 固体分散体。
Fig. 2 DSC curve
A-W3D raw materials; B-PVP K30; C-physical mixture; D-W3D solid dispersion.

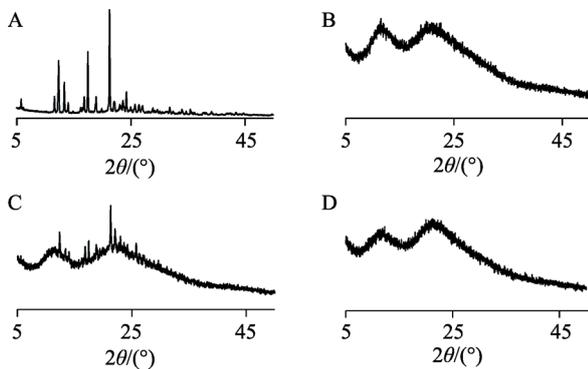


图 3 X 射线粉末衍射谱图
A-W3D 原料药; B-PVP K30; C-物理混合物; D-W3D 固体分散体。
Fig. 3 X-ray powder diffraction
A-W3D raw materials; B-PVP K30; C-physical mixture; D-W3D solid dispersion.

3.2 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝脏指数的影响

模型组小鼠肝组织呈现坏死、发黑充血、颗粒状, 肝脏指数显著升高; W3D 固体分散体作用后, 肝组织颜色与形态均明显改善, 且肝脏指数显

著降低, 并呈现一定的剂量依赖性, 且对肝损伤的改善作用略优于阳性药和原料药。结果见图 4。

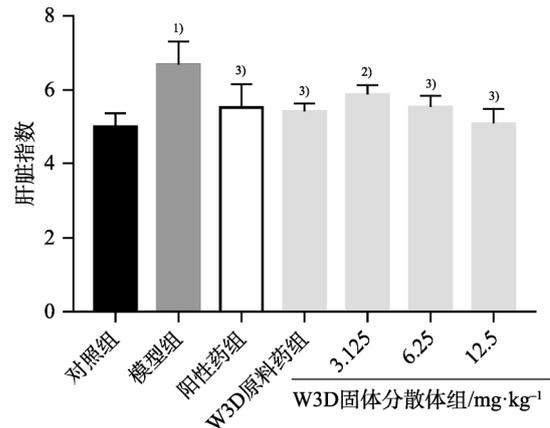


图 4 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of W3D-PVP solid dispersion on organ index in APAP induced acute liver injury mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.3 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝组织病理学的影响

与对照组相比, 模型组肝组织大面积坏死伴重度出血, 可见大量的细胞胞核固缩、碎裂或溶解(蓝色箭头), 红细胞分布较广(黑色箭头), 且与周围组织融合形成无结构的嗜酸性物(橙色箭头); 与模型组相比, 阳性药组与原料药组肝组织血管周围坏死灶略有减轻, 出血减少, 但细胞胞核固缩、碎裂或溶解仍较多, 仍分布有大量嗜酸性物(橙色箭头); 而 W3D 固体分散体高剂量组肝组织血管周围未见细胞胞核固缩、碎裂或溶解, 未见坏死灶, 未见出血及胞质嗜酸性改变, 肝脏病理学变化得到明显改善。结果见图 5。

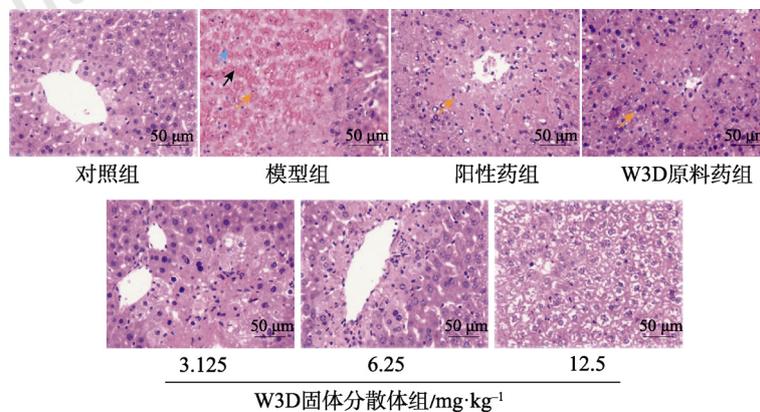


图 5 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝组织病理学的影响(HE, 400×)

Fig. 5 Effect of W3D-PVP SD on liver histopathology of ALI mice induced by APAP(HE, 400×)

3.4 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠血清中 ALT、AST 含量的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清中 ALT、AST 含量显著升高, W3D 固体分散体作用后,可显著降低 ALT、AST 含量,呈现出明显的剂量依赖性,结果见图 6。其中 W3D 原料药剂量为 $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,其活性与等剂量的阳性药相当;而 W3D 固体分散体主药剂量为 $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,其活性优于阳性药,差异具有统计学意义。

3.5 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 含量的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清中 TNF- α 、

IL-6 的含量显著升高, W3D 固体分散体作用后, TNF- α 、IL-6 含量明显降低,并呈一定的剂量依赖性。W3D 固体分散体高剂量组活性均明显优于阳性药组,对 TNF- α 、IL-6 的抑制活性可达 97.33%, 97.93%。结果见图 6。

3.6 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝组织中 GSH、SOD 及 MDA 含量的影响

与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 GSH 含量、SOD 活力显著降低,而 MDA 含量显著升高。与模型组相比, W3D 各组均可升高 GSH 含量及 SOD 活力,降低 MDA 含量,差异具有统计学意义。结果见图 7。

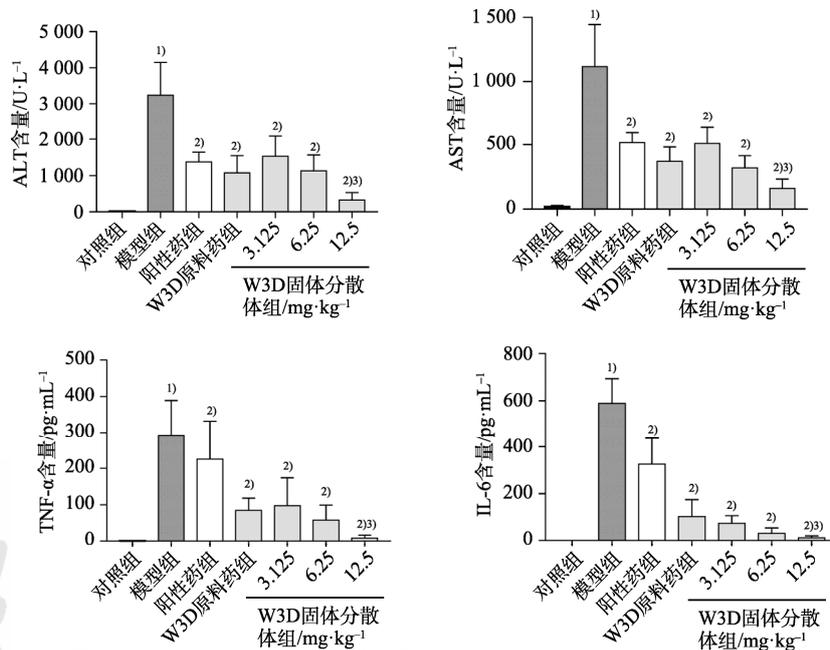


图 6 W3D 固体分散体对 ALI 小鼠血清 ALT、AST、TNF- α 、IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$; 与阳性药组相比, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effects of W3D-PVP SD on serum ALT, AST, TNF- α and IL-6 levels in mice with ALI ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with NAC group, ³⁾ $P<0.01$.

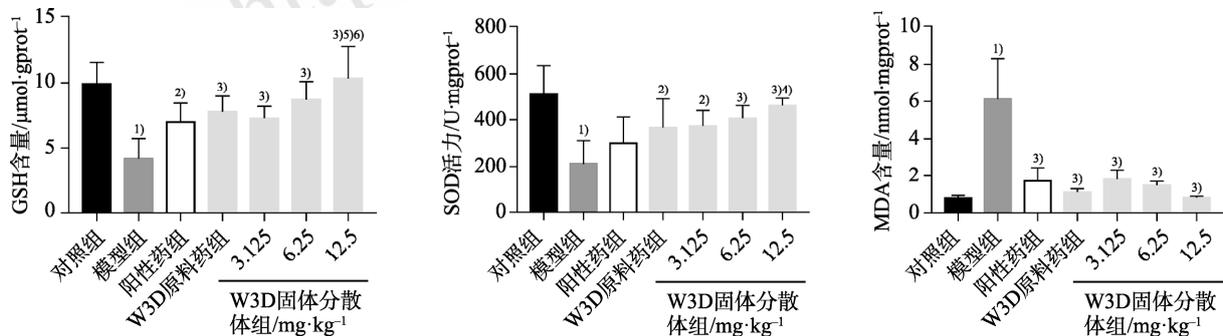


图 7 W3D 固体分散体对 APAP 小鼠肝组织 GSH、SOD 及 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与阳性药组相比, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$; 与 W3D 原料药相比, ⁶⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 7 Effects of W3D-PVP SD on liver GSH, SOD and MDA levels in mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with NAC group, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$; compared with W3D raw material group, ⁶⁾ $P<0.05$.

3.7 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝组织中 MD2 表达的影响

与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 MD2 含量显著升高;W3D 固体分散体作用后,MD2 含量

降低,且呈一定剂量依赖性。在主药剂量一致的情况下,W3D 固体分散体较原料药呈现显著优势($P<0.05$)。结果见图 8。

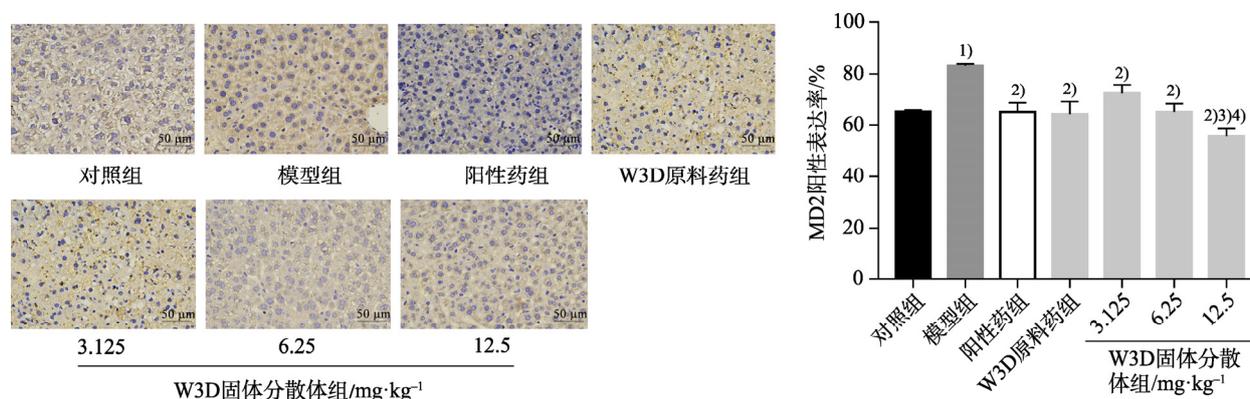


图 8 W3D 固体分散体对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝组织中 MD2 表达的影响(IHC, 400 \times) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$; 与阳性组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 W3D 固体分散体相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 8 Effects of W3D solid dispersion on liver MD2 expression in mice with acute liver injury(IHC, 400 \times) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with NAC group, ³⁾ $P<0.05$; compared with W3D solid dispersion group, ⁴⁾ $P<0.05$.

4 讨论

W3D 在呈现出较优抗炎活性的同时,水溶性制约了其体内药效,而固体分散体为解决水溶性提供了有效策略。本研究以体外溶出度为指标对制备方法及辅料进行了筛选,发现将 W3D 制成固体分散体后,可显著提高其溶出度,其中以 PVP K30 为辅料、1:7 为投料比时溶出度最佳,但受 W3D 结构的影响,仍存在随时间的延长,溶出物有所聚集的现象,需要在后续研究中继续加以优化。采用 DSC 和 XRD 手段表征固体分散体的物相变化,同时对其饱和溶解度、溶出重现性进行考察。结果表明其显著提高了 W3D 的水溶性,且质量符合固体分散体的基本要求。前期实验已证明 W3D 无明显的毒性效应,在安全剂量下,选择 W3D 原料药 12.5 mg \cdot kg⁻¹、W3D 固体分散体 12.5, 6.25, 3.125 mg \cdot kg⁻¹ 的剂量进行肝损伤研究。

APAP 诱导的 ALI 与氧化应激和炎症密切相关,作为高效抗炎活性的 W3D 可显著抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达;同时本实验还发现 W3D 亦可通过升高 GSH、SOD,降低 MDA 的表达而抑制氧化应激反应发挥保肝作用。MD2 蛋白作为 TLR4 受体辅助糖蛋白在炎症反应中表达升高^[13],其在血管紧张素 II 诱导的小鼠肝脏炎症和纤维化及非酒精性脂肪等肝脏损伤中均可高表达^[14],调控

炎症反应相关通路。研究发现其可能为肝损伤潜在治疗靶点^[15]。在前期研究中 W3D 表现出显著的 MD2 蛋白抑制活性,免疫组化检测发现 W3D 可降低 APAP 诱导的小鼠 ALI 模型中 MD2 蛋白的表达,因此推测其可通过降低 MD2 蛋白表达,抑制氧化应激和炎症而发挥肝保护作用,本实验为进一步治疗药物性肝损伤药物的研发提供了重要依据。

REFERENCES

- [1] 陈建彤, 卢露, 金之怡, 等. 对乙酰氨基酚所致急性肝损伤防治的研究进展[J]. 温州医科大学学报, 2021, 51(7): 593-599.
- [2] XIE B, FAN K R. NAC alleviates oxidative liver injury induced by acetaminophen via regulating STAT3[J]. Genom Appl Biol(基因组学与应用生物学), 2020, 39(10): 4852-4859.
- [3] WANG Y, ZHAO Y, WANG Z C, et al. Peroxiredoxin 3 inhibits acetaminophen-induced liver pyroptosis through the regulation of mitochondrial ROS[J]. Front Immunol, 2021(12): 652782.
- [4] 王帆, 朱翊瑞, 刘成海, 等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的分子机制[J]. 肝脏, 2021, 26(8): 939-942.
- [5] CHANG H L, FANG G D, WAN Y, et al. Protective role of metformin against acetaminophen-induced acute liver injury in mice[J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2021, 52(4): 451-455.
- [6] 胡婷, 黄文祺, 孙航. 对乙酰氨基酚肝毒性的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(3): 279-283.

- [7] SHI X Y, GAO X H, ZHAO B, et al. W3D improves LPS-induced acute lung injury in mice by regulating TLR4/MD2-NF- κ B signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2021, 37(5): 657-661.
- [8] LUO J R. Anti-inflammatory effect and mechanism of a novel benzoxazolone derivative W3D in LPS-induced RAW264.7 cells[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.
- [9] LUO J R, ZHAO B, TANG L, et al. Inhibitory effect of compound W3D on LPS-induced release of inflammatory mediators of RAW264.7 cells through TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2018, 34(7): 977-982.
- [10] XIAO Z F. Preparation of a solid dispersion of curcumin derivative C086 and study of its antitumor activities[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2014.
- [11] ZHOU T. Preparation and evaluation of solid dispersion of daidzein phospholipid complex[D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2019.
- [12] WANG Y, ZHANG L W. Ameliorative effect and mechanism of probiotics combined with resveratrol on chronic alcoholic liver injury in mice[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2022(5): 374-380.
- [13] TANDON A, HARIOUDH M K, ISHRAT N, et al. An MD2-derived peptide promotes LPS aggregation, facilitates its internalization in THP-1 cells, and inhibits LPS-induced pro-inflammatory responses[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(13): 2431-2446.
- [14] ZHANG Y, LIU H, JIA W J, et al. Myeloid differentiation protein 2 mediates angiotensin II-induced liver inflammation and fibrosis in mice[J]. Molecules, 2019, 25(1): 25.
- [15] ZHANG Y L, WU B B, ZHANG H L, et al. Inhibition of MD2-dependent inflammation attenuates the progression of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 936-947.

收稿日期: 2021-10-03

(本文责编: 曹粤锋)

中国现代应用药学
http://www.chinjmap.com