

综上所述, 本研究表明蛇床子素能显著提高乳腺癌细胞对 TRAIL 的敏感性, 并通过 cIAP2/RIP1 途径使乳腺癌细胞在 TRAIL 的治疗下易于形成死亡受体复合物, 进而诱导肿瘤细胞进入凋亡程序。这些研究为如何提高 TRAIL 的抗肿瘤活性提供了新的思路 and 理论依据。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] HUANG X E, WANG L, LI L, et al. Safety of Lienal Polypeptide injection combined with chemotherapy in treating patients with advanced cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(17): 7837-7841.
- [3] KIM B, STEPHEN S L, HUGHES T A, et al. Chemotherapy induces Notch1-dependent MRP1 up-regulation, inhibition of which sensitizes breast cancer cells to chemotherapy [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 634-645.
- [4] LAUSSMANN M A, PASSANTE E, REHM M, et al. Proteasome inhibition can impair caspase-8 activation upon submaximal stimulation of apoptotic tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) signaling [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14402-14411.
- [5] HARI Y, HARASHIMA N, HARADA M, et al. Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 41902-41915.
- [6] AMARANTE-MENDES G P, GRIFFITH T S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond [J]. *Pharmacol Ther*, 2015(155): 117-131.
- [7] TRIVEDI R, MISHRA D P. Trailing TRAIL resistance: Novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2015(5): 69-88. Doi: 10.3389/fonc.2015.00069.
- [8] FINLAY D, VAMOS M, VUORI K, et al. Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: roles of XIAP and cIAPs [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(1): 5-15.
- [9] BALAYSSAC S, GILARD V, MALET-MARTINO M, et al. Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: first characterization of propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine and tetrahydropalmatine as adulterants [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012(63): 135-150.
- [10] LIN K, GAO Z, FU Q, et al. Osteole suppresses the proliferation and accelerates the apoptosis of human glioma cells via the upregulation of microRNA-16 and downregulation of MMP-9 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4592-4597.
- [11] SUN J G, XIANG J, LIU F Y, et al. Clitocine induces apoptosis and enhances the lethality of ABT-737 in human colon cancer cells by disrupting the interaction of Mcl-1 and Bak [J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2): 253-263.
- [12] SESSLER T, HEALY S, SZEGEZDI E, et al. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signaling [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140(2): 186-199.
- [13] BERTRAND M J, LIPPENS S, VANDENABEELE P, et al. cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4) [J]. *PloS One*, 2011, 6(9): e22356. Doi: 10.1371/journal.pone.0022356.
- [14] LI X H, DONG L, HOU X Y, et al. Apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by aloe polysaccharide through the mitochondrial pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(3): 270-274.
- [15] KANTARI C, WALCZAK H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(4): 558-563.
- [16] DE ALMAGRO M C, VUCIC D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy [J]. *Exp Oncol*, 2012, 34(3): 200-211.
- [17] SELMI T, ALECCI C, ZANOCCO-MARANI T, et al. ZFP36 stabilizes RIP1 via degradation of XIAP and cIAP2 thereby promoting ripoptosome assembly [J]. *BMC Cancer*, 2015(15): 357-363.

收稿日期: 2016-01-29

葛根素 PEG-PE 纳米胶束的制备及降低红细胞溶血的初步研究

方瑞华, 梁卫青, 张佳军(浙江中医药大学附属嘉兴中医院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 采集葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD)缺陷的动物模型血液, 评价葛根素 PEG-PE 纳米胶束降低红细胞溶血的作用。方法 1%乙酰苯胺皮下注射大鼠制备 G6PD 缺陷的动物模型, 取其红细胞制成混悬液, 比较评价葛根素和葛根素 PEG-PE 纳米胶束的溶血作用、红细胞脆性及红细胞膜流动性。结果 葛根素出现了明显的红细胞溶血, 且随着浓度变化和孵育时间延长具有增加的趋势, 溶血率高达 38%, 而葛根素 PEG-PE 纳米胶束未见明显溶血; 另外, 红细胞脆性实验结果表明, 葛根素 PEG-PE 纳米胶束对红细胞膜的作用非常轻微, $H_{50\%}$ 为 $(42.1 \pm 1.1)\%$, 显著小于葛根素的该数值 $(53.1 \pm 1.2)\%$, 红细胞膜流动性结果表明, 葛根素 PEG-PE 纳米胶束对红细胞膜的流动性影响非常轻微。结论 葛根素 PEG-PE 纳米胶束良好的血液相容性, 为该药物的体内研究和进一步新型药物制剂开发奠定基础。

作者简介: 方瑞华, 女, 副主任中医师 Tel: 13317495546 E-mail: 779229498@qq.com

关键词: 葛根素 PEG-PE 纳米胶束; 红细胞溶血; 红细胞脆性; 红细胞膜流动性

中图分类号: R944.9; R965.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)09-1147-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.013

Preparation of Puerarin-loaded PEG-PE Nano-micelle and Its Reducing Hemolysis Effect

FANG Ruihua, LIANG Weiqin, ZHANG Jiajun(The Affiliated Jiaying Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Chinese Medical University, Jiaying 314001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore and analyze the reducing hemolytic effects of puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle via the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient rats blood. **METHODS** The rat model with G6PD-deficiency was established via injecting 1% acetylphenyl-hydrazine. Then the G6PD-deficient erythrocyte suspension obtained from this rat model was used to evaluate the hemolytic effects of PUE and puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle via hemolytic activity, erythrocyte osmotic fragility assay and membrane fluidity of erythrocytes. **RESULTS** PUE could cause a serious hemolysis to the erythrocyte suspension with the increase of drug concentration and the prolongation of drug incubation time, the hemolytic rate of PUE was up to 38%, while PEG-PEN revealed no significant hemolysis. Additionally, the result of erythrocyte osmotic fragility indicated that puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle exerted a slight effect on the erythrocyte membranes, its $H_{50\%}$ was $(42.1 \pm 1.1)\%$, much less than that $(53.1 \pm 1.2)\%$ of PUE. Erythrocyte membrane fluidity indicated that the effect of puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle on erythrocyte membrane fluidity was very slight. **CONCLUSION** The good blood compatibility of puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle makes it a favorable candidate for *in vivo* tests and puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle can also provide the useful insight for the further formulation development as an innovative drug.

KEY WORDS: puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle; hemolysis; erythrocyte osmotic fragility; membrane fluidity of akaryocyte

葛根素是从中药野葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi 中提取的主要有效成分,具有扩张冠状动脉、改善缺血心肌代谢、减慢心率、保护缺血心肌等多种药理作用,临床上常用葛根素注射液治疗心脑血管疾病,且疗效确切^[1-3]。虽然葛根素在临床上应用十分广泛,但急性血管内溶血反应严重,极大限制了葛根素的临床应用。PEG-PE 为美国 FDA 批准的药用高分子材料,并且无毒、无免疫原性和无抗原性,常用来包裹蛋白质、多肽、肿瘤小分子药物等,制成载药纳米胶束,很大程度上延长药物体内作用时间,提高生物利用度,增加药效,还可减少原型药物的不良反应^[4-5]。基于此,本研究拟采用 PEG-PE 纳米胶束包裹葛根素,减少其红细胞溶血不良反应。

1 材料

1.1 仪器与试剂

SP-Max 2300A2型光吸收型全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司);AR224CN分析天平(广州市怡华新电子仪器有限公司);SIGMA3-15台式离心机(德国SIGMA公司);SPX-150B-Z生化培养箱(北京京海佳业科贸有限公司)。

葛根素注射液[以下简称PUE,陕西省安康市天宝制药有限公司,批号:151016,规格:

2 mL·(100 mg)⁻¹];葛根素原料药(国药集团威奇达药业有限公司,批号:141211,纯度:99.2%);PEG-PE(北京凯正生物工程发展有限责任公司,分子量约4 000 Da);生理盐水(北京双鹤药业股份有限公司)。

1.2 动物

SD大鼠,♂,220~270 g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)2013-0011。

2 方法

2.1 葛根素 PEG-PE 纳米胶束的制备

吸取适量 20 mg·mL⁻¹的葛根素乙醇溶液和 20 mg·mL⁻¹ PEG-PE 的三氯甲烷溶液置旋蒸瓶中,再加入适量三乙胺,混合均匀。于 40 °C 恒温水浴中用旋转仪除去有机溶剂形成含药脂膜,再真空干燥除尽残留的有机溶剂。于上述脂膜中加入 HBS(5 mmol·L⁻¹ HEPES, 0.9% NaCl, pH 7.0)缓冲溶液,充氮气,密封,于 40 °C 恒温水浴中水化 30 min,室温下放置 2 h 后,过 0.2 μm 的无菌滤膜,冷冻干燥,即得葛根素 PEG-PE 纳米胶束。

2.2 载药量及包封率的测定

取葛根素PEG-PE纳米胶束适量,采用适量 Milli-Q水溶解,精密吸取0.5 mL,加入4.5 mL有机流动相稀释,涡旋混合提取药物,取40 μL药物提

取液注入高效液相色谱仪中,记录峰面积,根据标准曲线计算包载于PEG-PE纳米胶束中葛根素的药物总量(M_{load}),除以葛根素PEG-PE纳米胶束总质量(M_{total}),按下式(1)计算载药量(WT);精密吸取葛根素PEG-PE纳米胶束水溶液0.5 mL,置于MWCO超滤管中,10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心15 min,采用HPLC测定下层液中游离葛根素的总量(M_{free}),按下式(2)计算包封率(EE)。

$$WT(\%) = \frac{M_{load}}{M_{total}} \times 100\% \quad (1)$$

$$EE(\%) = (1 - \frac{M_{free}}{M_{load}}) \times 100\% \quad (2)$$

2.3 红细胞悬浮液的制备

采用对红细胞内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD)活性有干扰作用的强氧化剂乙酰苯肼(acetylphenylhydrazine, APH)为造模药,复制G6PD酶活性降低大鼠模型。采用1%APH生理盐水溶液以1 mL $\cdot$ (100 g) $^{-1}$ 剂量给健康♂大鼠作皮下注射,每天上午1次,连续2次,造模第2天晚上禁食,12 h后从腹主动脉采集新鲜血样,小心注入抗凝管中保存,采用PBS小心洗涤红细胞溶液,1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心4 min,重复5~6次,直至上清液清亮,配制成所需(10%, 50%)浓度的红细胞混悬液^[6-7]。

2.4 溶血率与时间关系

2.4.1 5%的葛根素注射液的配制 取葛根素注射液1支,精密吸取葛根素注射液500 μ L,加入生理盐水稀释至5 mL,即得5%的葛根素注射液。

2.4.2 5%葛根素PEG-PE纳米胶束溶液的配制 精密称取葛根素PEG-PE纳米胶束约500 mg(含葛根素50 mg),用10 mL生理盐水溶解,使用前临时配制,即得5%葛根素PEG-PE纳米胶束溶液。

2.4.2 红细胞溶血率的测定 移取配制好的5%葛根素注射液和葛根素PEG-PE纳米胶束各200 μ L至洁净EP管中,阴性对照管加200 μ L生理盐水,阳性对照管加200 μ L蒸馏水;然后用移液枪吸取10%红细胞悬液200 μ L,添加到各管中,低速漩涡30 s,使红细胞悬液与受试物混合均匀。各管置于37 $^{\circ}C$ 生化培养箱中孵育,分别于0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h将受试物从生化培养箱中取出,观察血样凝集反应。每管以1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心,精密吸取上清液150 μ L,转移到96孔酶标板,用酶标仪于540 nm下测定吸光度(OD),按以下公式计算溶血

百分率,每个样品平行3次试验。

溶血率(%)=(样品管OD值-阴性对照管OD值)/(阳性对照管OD值-阴性对照管OD值) $\times$ 100%。

2.5 溶血率与浓度关系

2.5.1 受试液的配置 取配制好的5%葛根素注射液,依次用生理盐水倍半稀释成葛根素浓度为5‰, 2.5‰, 1.25‰, 0.625‰, 0.313‰, 0.157‰, 0.079‰, 0.04‰的系列溶液,同样的方法可制备系列等浓度的葛根素PEG-PE纳米胶束溶液。

2.5.2 红细胞溶血率的测定 移取配制好的葛根素和葛根素PEG-PE纳米胶束系列溶液各200 μ L至洁净EP管中,培养箱中孵育时间为4 h,其余同“2.4.2”项下红细胞溶血率的测定方法。

2.6 红细胞渗透脆性试验

2.6.1 NaCl系列溶液的制备 将1%NaCl溶液和蒸馏水进行配比,制备成浓度为0.176%~0.819%的系列NaCl溶液,备用。

2.6.2 受试药的配制 ①0.25%葛根素配制:精密称取葛根素 10 mg,与“2.6.1”项下不同浓度的NaCl溶液4 mL混合均匀,即得。②0.25%葛根素PEG-PE纳米胶束的配制:精密称取葛根素PEG-PE纳米胶束12.5 mg(含葛根素1.25 mg),与“2.6.1”项下不同浓度的NaCl溶液0.5 mL混合均匀,即得。③空白对照组:取“2.6.1”项下不同浓度的NaCl溶液0.5 mL,加入红细胞悬液20 μ L,即得。

2.6.3 红细胞渗透脆性的测定 用移液枪精密吸取50%红细胞悬液20 μ L,加入到已添加药物的系列NaCl溶液(0.25%葛根素或0.25%葛根素PEG-PE纳米胶束)中,各管置于37 $^{\circ}C$ 生化培养箱中孵育3 h,其余同“2.4.2”项下红细胞溶血率的测定方法,以生理盐水管为阴性对照管,蒸馏水管为阳性对照管,计算出各管的溶血百分率。最后采用合适的数学模型,建立NaCl浓度与溶血率的关系,计算葛根素PEG-PE纳米胶束组、葛根素组和空白给药组各自的 $H_{50\%}$ (当红细胞溶血率为50%时所对应的NaCl浓度)。

2.7 红细胞膜流动性

以四氢呋喃作溶剂配制 2×10^{-3} mol $\cdot$ L $^{-1}$ 的储存液,于棕色瓶中4 $^{\circ}C$ 低温保存,四氢呋喃工作液临用前以等渗PBS稀释。采用PBS配置浓度为0.25%的葛根素和葛根素PEG-PE纳米胶束溶液,

加入适量浓度为 50% 的红细胞悬液，再与四氢呋喃工作液等体积混匀，于 37 ℃ 水浴孵育 2 h，检测偏振荧光(激发光波长：362 nm，发射光波长：430 nm)，以空白对照组为基准，按下列公式计算荧光强度 I 、荧光偏振度 P 和微粘度 η ，比较 2 组药物对红细胞膜流动性的影响^[8]。

$$P = \frac{IVV - GIVH}{IVV + GIVH}$$

$$\eta = \frac{2P}{(0.46 - P)}$$

式中 IVV 和 IVH 分别是起偏和检偏器光轴为垂直和水平方向时测得的荧光强度， G 是校正因子。

2.8 统计学处理

所获数据采用 SPSS 13.0 处理，各处理组之间的差异进行样本 t 检验。

3 结果

3.1 载药量及包封率

经 HPLC 测定，葛根素 PEG-PE 纳米胶束的载药量为 $(10.2 \pm 1.3)\%$ ，包封率为 $(87.9 \pm 4.6)\%$ ，且重复性和稳定性良好，可用于溶血试验。

3.2 溶血率与时间关系

由图 1 数据分析可知，葛根素注射液诱导的红细胞溶血随时间延长，具有明显增长趋势，见图 1。而葛根素 PEG-PE 纳米胶束的红细胞溶血百分率曲线比较平缓，基本维持在 $5\% \sim 8\%$ 左右，表明 PEG-PE 纳米胶束可以明显减少葛根素的红细胞溶血现象。

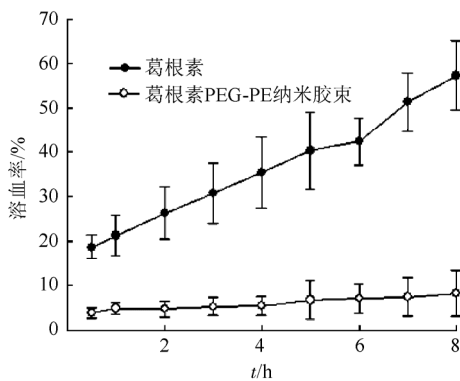


图 1 葛根素 PEG-PE 纳米胶束和葛根素诱导的溶血与时间的关系

Fig. 1 The relationship between time and hemolysis induced by PUE and puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle

3.3 溶血率与浓度关系

由图 2 可知，在低浓度条件下，葛根素注射液的溶血百分率相对比较小，当药物浓度增大时，尤其当葛根素浓度较高时，葛根素注射液的溶血百分率达 38% 左右，恰好与文献报道葛根素注射

液一般在高浓度时出现红细胞溶血不良反应现象相一致^[6]。而葛根素 PEG-PE 纳米胶束的溶血百分率仅约 $4\% \sim 8\%$ ，几乎没有出现明显的溶血现象，表明 PEG-PE 纳米具有一定的抗红细胞溶血作用。结果见图 2。

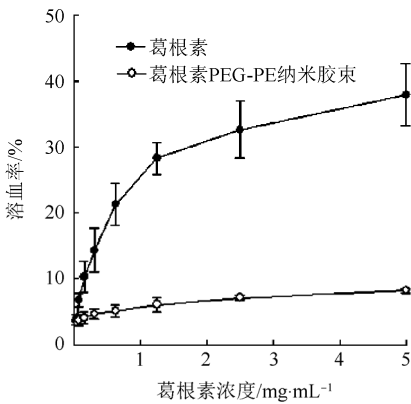


图 2 溶血与不同浓度的葛根素 PEG-PE 纳米胶束和葛根素的对比研究

Fig. 2 Comparison of the hemolytic effects induced by different concentration of PUE and puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle

3.4 红细胞渗透脆性

葛根素 PEG-PE 纳米胶束组、空白给药组和葛根素组的红细胞脆性具体结果见图 3。葛根素 PEG-PE 纳米胶束的红细胞溶血率明显比葛根素注射液要小。葛根素 PEG-PE 纳米胶束组对红细胞脆性的影响甚至比空白对照组要小，可能原因是 PEG-PE 纳米胶束包裹葛根素药物后，由于 PEG-PE 良好的血液相容性，PEG-PE 为长链状的大分子结构，缠绕并附着在红细胞表面，减少红细胞之间的相互碰撞和作用，从而加强了红细胞的相对空间布局有关。由表 1 的曲线拟和结果分析，葛根素、空白对照组和葛根素 PEG-PE 纳米胶束组 $H_{50\%}$ 分别为 $(53.1 \pm 1.2)\%$ ， $(49.2 \pm 0.9)\%$ ， $(42.1 \pm 1.1)\%$ ，该方程表明葛根素 PEG-PE 纳米胶束组对红细胞脆性的影响明显小于葛根素药物组，对红细胞膜的损伤作用非常轻微。

表 1 红细胞脆性的回归方程($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Curvilinear equation of osmotic fragility curves of rat erythrocytes($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

药物	代表性曲线方程	$H_{50\%}$
空白对照	$y = 2.4164 + \frac{89.3737}{1 + e^{(x-0.4875)/0.0387}}$, $r=0.9992$	49.2 ± 0.9
葛根素PEG-PE 纳米胶束	$y = -2.4517 + 111.2349e^{-4.0391x}$, $r=0.9962$	42.1 ± 1.1
葛根素	$y = 12.9447 + \frac{82.49}{1 + e^{(x-0.5243)/0.0363}}$, $r=0.9990$	53.1 ± 1.2

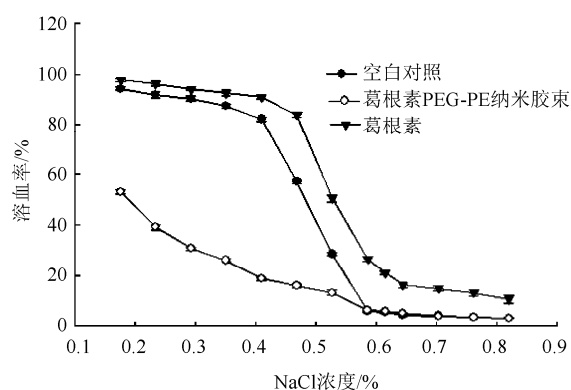


图3 葛根素 PEG-PE 纳米胶束、葛根素和空白溶液红细胞脆性的对比研究

Fig. 3 Comparison of osmotic fragility curves of rat erythrocytes in the absence and in the presence of PUE or puerarin-loaded PEG-PE nano-micelle

3.5 红细胞膜流动性

与空白对照组比较, 葛根素组的荧光偏振度明显增大, 微黏度明显增大, 红细胞膜流动性显著下降; 葛根素 PEG-PE 纳米胶束组荧光偏振度与葛根素组相比显著减少, 基本与空白对照组数据相近, 表明 PEG-PE 纳米胶束具有稳定红细胞膜, 降低流动性的作用。结果见表 2。

表2 各组药物对红细胞膜流动性的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of each group on the membrane fluidity of erythrocyte membrane($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	P	η
空白对照	0.221 ± 0.007	2.107 ± 0.005
葛根素PEG-PE纳米胶束	$0.252 \pm 0.003^{1)}$	$2.325 \pm 0.006^{2)}$
PUE	0.357 ± 0.006	6.287 ± 0.008

注: 与PUE组比较, $^{1)}P < 0.05$, $^{2)}P < 0.01$ 。

Note: Compared with PUE group, $^{1)}P < 0.05$, $^{2)}P < 0.01$.

4 讨论

尽管目前关于葛根素注射剂溶血不良反应的研究报道很多, 但具体发生机制仍是未知。目前临床研究发现^[9], 葛根素注射剂引起的血管内溶血属于 II 型变态反应, 但无法解释临床上口服葛根素却未发生免疫性溶血, 故此结论有待进一步论证。岳鹏飞等^[10]报道, 采用葛根素亚微乳静脉注射可明显减少溶血不良反应的发生, 但作用机理尚不明确, 只说可能与亚微乳的包裹作用有关。尽管如此, 普遍因为葛根素注射剂导致的红细胞溶血现象属于药源性不良反应。在大剂量情况下, 葛根素可在体内形成一种药物性半抗原, 刺激机体产生特异性抗体, 然后激活补体, 导致红细胞

破坏, 因而出现了溶血等一系列不良反应。一般情况下, 葛根素同其他黄酮类物质一样对红细胞膜脂质过氧化损伤具有防护作用, 但在特殊条件下亦有可能对红细胞起损伤作用。老年患者由于年龄较大且经常患病, 常常影响红细胞膜的稳定性。另外, 老年人肝肾代谢功能逐渐衰退, 葛根素注射剂临床剂量又偏大, 一般为 $200 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 很容易在体内形成蓄积。所以, 体质较弱的老年人群最有可能出现红细胞溶血不良反应。故本实验采用对红细胞内G6PD活性有干扰作用的强氧化剂(APH)进行造模, 制作G6PD缺陷(G6PD酶活性降低)大鼠模型, 模拟临床上红细胞膜相对比较脆弱的病理症状, 便于比较葛根素PEG-PE纳米胶束与葛根素诱导的红细胞溶血差异。

PEG-PE是在体内可降解并经FDA批准的可用于人体的药物载体材料, 具有良好的生物相容性和安全性。从葛根素PEG-PE纳米胶束和葛根素红细胞溶血率的对比研究发现, 在低剂量情况下, 两者没显示明显差别, 在高剂量情况下, 葛根素出现了明显的红细胞溶血现象。而葛根素PEG-PE纳米胶束的溶血率始终保持在4%~8%。由此表明, PEG-PE纳米胶束可以降低葛根素的红细胞溶血, 可能的原因是葛根素经PEG-PE纳米胶束包裹后, 抗原性被PEG-PE大分子掩盖。从葛根素PEG-PE纳米胶束和葛根素红细胞脆性结果分析, 两者的 $H_{50\%}$ 分别为42.1%和53.1%, 葛根素PEG-PE纳米胶束的 $H_{50\%}$ 甚至比空白给药组 $H_{50\%}$ 值(49.2%)要小。可能的原因是PEG-PE为血溶性良好的药用高分子辅料, 长链状的大分子体系, 能缠绕并附着在红细胞周围, 从而减少红细胞相互之间的聚集, 类似固化了整个红细胞体系的空间布局, 大大减少了红细胞之间相互碰撞出现溶血的几率。所以, 葛根素PEG-PE纳米胶束对红细胞的损伤比较轻微, 同时该结论也可为PEG-PE纳米胶束降低葛根素的红细胞溶血现象提供一些科学解释。另外, 红细胞膜流动性结果表明, PEG-PE纳米胶束具有稳定红细胞膜, 降低流动性的作用。也可为PEG-PE纳米胶束降低葛根素的红细胞溶血现象提供科学依据。

综上所述, 葛根素PEG-PE纳米胶束很大程度上可以降低原型药物的溶血不良反应, 可能与PEG-PE本身为药用辅料的无毒、无免疫原性及大分子体系的缠绕包裹减少红细胞之间的碰撞有

关。另外, 由于葛根素PEG-PE纳米胶束可以降低免疫原性, 针对于葛根素的抗原性引发的过敏反应, 如药物热、药疹、荨麻疹等很可能也会减少, 有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] YU J Q, GAO E. Research progress in pharmacological activities of puerarin on cardio-cerebral-vascular system [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2008, 17(24): 3880-3882.
- [2] ZHANG H Y, LI D W, SHI C H. Advances in studies on clinical practice of puerarin [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2012, 27(1): 75-78.
- [3] HUANG P, GONG Y S, FAN XW, et al. Effect of puerarin on Apelin/APJ system in right ventricle of pulmonary hypertensive rats induced by hypoxia-hypercapnia [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(4): 565-569.
- [4] WU J H, DUAN J H, XU H Y, et al. Quercetin-loaded PEG-PE micelles reverse drug resistance of MCF-7 ADRr human breast cancer cells [J]. Basic Med Sci Clin(基础医学与临床), 2015, 35(2): 174-177.
- [5] CUI Y B, JI K H, ZHAO H X, et al. Preparation and *in vitro* characterization of amphotericin B PEG-PE micelles [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2014, 31(10): 760-767.
- [6] GANESAN S, CHAURASIYA N D, SAHU R, et al. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway [J]. Toxicology, 2012, 294(1): 54-60.
- [7] KO C H, LI K, LI C L, et al. Development of a novel mouse model of severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficiency for *invitro* and *in vivo* assessment of hemolytic toxicity to red blood cells [J]. Blood Cells Mol Dis, 2011, 47(3): 176-181.
- [8] LIU X Y, LI J H, HU X B, et al. Study on reducing hemolysis by PEGylated puerarin *in vivo* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(4): 402-405.
- [9] QU G H, DING X S. Logistic regression analysis on influential factors of ADR caused by puerarin injection [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2014, 34(14): 1203-1206.
- [10] YUE P F, YUAN H L, ZHU W F, et al. The study to reduce the hemolysis side effect of puerarin by a submicron emulsion delivery system [J]. Biol Pharm Bull. 2008, 31(1): 45-50.

收稿日期: 2016-02-01

复方楂金颗粒中试生产及质量评价研究

李兆翌¹, 施军平², 包剑锋¹, 许静¹, 蒋小琴¹, 田静^{1*} (1. 杭州市西溪医院, 杭州 310023; 2. 杭州师范大学附属医院, 杭州 310015)

摘要: 目的 确立复方楂金颗粒中试生产工艺, 并进行质量综合评价。方法 以中试规模要求, 药材投料量为复方楂金颗粒处方量的 10 倍, 在小试工艺基础上, 制备 3 批复方楂金中试颗粒, 对中试工艺的技术参数进行考察, 以浸膏得率、流动性、成型率、溶化率、堆密度、吸湿性、含量测定为考察指标; 按照颗粒剂相关检查项目对 3 批中试产品进行粒度、水分、溶化性、装量差异检查, 对其制备工艺进行综合评价。结果 复方楂金颗粒中试产品 3 批, 药材投料量 60 kg, 浸膏得率分别为 12.25%, 11.31%, 9.61%, 绿原酸含量分别为 0.016 5%, 0.017 4%, 0.017 1%; 采用湿法制粒, 浸膏粉: 乳糖: 可溶性淀粉=56: 7: 17(以不含水计算), 混匀, 以 85%乙醇为润湿剂制软材, 乙醇的用量为处方总量的 60%~75%, 成型率分别为 88.25%, 89.87%, 88.31%, 休止角、溶化率、堆密度符合颗粒剂制备要求, 平衡吸湿时间分别为 140.3, 136.5, 130.1 h; 颗粒剂相关检查均符合规定。结论 复方楂金颗粒中试工艺可靠, 连续生产的稳定性好, 工艺条件合理可行, 符合大生产要求。

关键词: 复方楂金颗粒; 中试生产; 质量评价

中图分类号: R283.6

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)09-1152-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.014

Study on Pilot Production and Quality Evaluation of Compound Zhajin Granules

LI Zhaoyi¹, SHI Junpin², BAO Jianfeng¹, XU Jing¹, JIANG Xiaoqin¹, TIAN Jing^{1*} (1. Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China; 2. The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China)

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y2111316); 杭州市医学重点专科专病项目计划(20120533Q12); 杭州市卫生科技计划(2013A44)

作者简介: 李兆翌, 女, 硕士 Tel: (0571)86481702 E-mail: emily.alice@163.com *通信作者: 田静, 女, 主任药师 Tel: (0571)86481702 E-mail: tjhz2002@aliyun.com