

自乳化给药系统对雷公藤甲素的减毒作用研究

章瑾^{1,2}, 谢明华³, 蔡鑫君², 游剑^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.杭州市红十字会医院, 杭州 310003; 3.杭州市余杭区第一人民医院, 杭州 311100)

摘要:目的 考察自乳化给药系统对雷公藤甲素的肝肾毒性影响。方法 构建荷人胃癌细胞株 MGC80-3 的裸鼠肿瘤模型, 分为模型对照组、雷公藤甲素原料药组和雷公藤甲素自微乳组, 灌胃给药, 每 2 天 1 次, 连续 23 d, 末次给药 24 h 后, 各组裸鼠采血收集血清, 检测各裸鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素、肌酐、总蛋白、白蛋白、球蛋白及血尿酸; 动物死亡后称重, 解剖取肝、肾, 观察形态, 计算肝、肾指数; 取各组裸鼠肝、肾组织病理切片, HE 染色后, 在生物显微镜下观察各组织形态学变化。结果 雷公藤甲素自微乳组与雷公藤甲素原料药组相比, 给药后裸鼠血清 AST 和 ALT 极显著下降($P<0.01$); 总蛋白显著升高($P<0.05$), 白、球蛋白比值极显著升高($P<0.01$); 血肌酐有下降趋势, 但无统计学意义; 尿素显著下降($P<0.05$); 尿酸极显著下降($P<0.01$)。雷公藤甲素自微乳组肝细胞轻微肿胀, 少见炎细胞灶状浸润; 雷公藤甲素原料药组肝组织出现脂肪变形, 肝细胞细胞核增大, 碎片状坏死, 中重度纤维化。2 组动物的肾脏组织均无明显病理特征。结论 雷公藤甲素自微乳的肝肾毒性明显小于雷公藤甲素原料药。

关键词: 雷公藤甲素; 自乳化给药系统; 毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)02-0168-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.008

引用本文: 章瑾, 谢明华, 蔡鑫君, 等. 自乳化给药系统对雷公藤甲素的减毒作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 168-171.

Study on the Antitoxic Effect of Self-microemulsifying Drug Delivery System on Triptolide

ZHANG Jin^{1,2}, XIE Minghua³, CAI Xinjun², YOU Jian^{1*} (1.College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003, China; 3.First People's Hospital of Yuhang District, Hangzhou 311100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the hepatotoxicity and renal toxicity of self-microemulsifying drug delivery system containing triptolide(TRL-SMEDDS) in mice. **METHODS** MGC80-3 human gastric tumor model in nude mice was constructed, and the mice were divided into model control group, triptolide(TRL) crude drug group and TRL-SMEDDS group. The mice were fed with saline, free TRL and TRL-SMEDDS, respectively, for once/2 days in 23 d. After 24 h of the last treatment, the serum of nude mice in each group were collected, and the level of ALT, AST, Urea, Scr, STP, ALB, GLOB and UA in serum were determined. The animals were weighed and the liver and kidney were also collected. The appearance and morphology of the liver and kidney were observed by the biological microscope after pathological section staining, and the liver and kidney index were calculated. **RESULTS** Compared with free TRL crude drug group, the level of AST and ALT in TRL-SMEDDS group was significantly declined($P<0.01$), STP level was increased significantly($P<0.05$), and A/G was also significantly rose ($P<0.01$). Scr level showed slightly decrease but had no statistical significance. Urea and UA level were decreased significantly($P<0.05$ and <0.01 , respectively). In TRL-SMEDDS group, liver cells were slightly swollen and a few inflammatory cells were found in liver tissue. In TRL crude drug group, some steatosis and fragmentation necrosis were showed in liver tissue. The hepatocyte nucleus obviously enlarged, and a large number of fibrous tissue was found. There were no obvious abnormal pathological features in renal tissue of both groups. **CONCLUSION** The TRL-SMEDDS presents a significantly decrease of hepatotoxicity and renal toxicity compared with free TRL.

KEYWORDS: triptolide; self-microemulsifying drug delivery system; toxicity

雷公藤甲素(triptolide, TRL)是雷公藤的主要活性成分, 其抗肿瘤活性较强, 对约 60 种肿瘤细胞株均有抑制作用, 同时与传统抗肿瘤药物如顺

铂、紫杉醇等药物相比具有更强的抗肿瘤活性, 具有广谱、高效等特点。但同时 TRL 也是毒性成分, 特别是对肝脏和肾脏存在较大的毒副作用^[1]。

基金项目: 浙江省自然科学基金青年项目(YY18H300008); 浙江省中医药科技计划项目(2016ZA170)

作者简介: 章瑾, 女, 药师 Tel: (0571)85609722 E-mail: brandyzzh@163.com *通信作者: 游剑, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88208443 E-mail: youjiandoc@zju.edu.cn

病理学研究表明,雷公藤的肝毒性为肝实质性损伤、肝细胞损伤和坏死^[2-3]。同时口服给药对胃肠道等其他器官的刺激性较大、不良反应多,使其在临床应用中受到极大限制。自乳化给药系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)作为近年来新开发的剂型,具有增加难溶性药物溶解性、改善口服药物吸收和生物利用度等优点^[4]。本研究主要考察 SMEDDS 对 TRL 肝肾毒性的影响。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Cobas-8000 全自动生化分析仪(瑞士罗氏公司);CX21 生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

TRL-SMEDDS 由本实验室自制(按中链甘油三酸酯:聚氧乙烯蓖麻油:聚乙二醇-400=13:58:29 比例混合后,投入适量原料药而制得,其中载药量为 $2.89 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;经马尔文 Nano-ZS90 型粒径分析仪测得自微乳平均粒径为 33.54 nm);TRL 原料药由南京泽朗医药科技有限公司提供(批号:20160509;纯度>99%);人胃癌细胞株 MGC80-3 购自中国科学院细胞库;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、血肌酐(Scr)、尿素(Urea)、尿酸(UA)和血清蛋白定量试剂盒购自德国罗氏。

1.2 动物

BALB-c 裸鼠 15 只,♂,体质量:(20 ± 2)g,由浙江大学动物实验中心提供,实验动物许可证编号:SYXK(浙)2013-0001。实验动物饲养环境温度 $20 \sim 24 \text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~70%,明暗交替 12 h/12 h,换气次数为每小时 10~20 次,实验动物自由饮水、摄食。

2 方法

2.1 分组、建模与给药

建立荷人胃癌细胞株 MGC80-3 裸鼠肿瘤模型,当瘤体长到 70 mm^3 时(约 2 周),将造模动物随机分为模型对照组、TRL 原料药组和 TRL-SMEDDS 组后给药(每组 5 只),给药方案如下:TRL-SMEDDS 组灌胃给予相当于 TRL 剂量为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (其中 TRL-SMEDDS 含 TRL $2.89 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);TRL 原料药组灌胃给予 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,模型对照组给予 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的生理盐水,每 2 天 1 次,连续 23 d。

2.2 血清中肝功能指标和肾功能指标检测

末次给药后禁食、禁水 24 h,称定各组裸鼠

体质量;麻醉后眼眶采血,收集血清;按照试剂盒操作方法测定血清 ALT、AST、Urea、Scr、总蛋白(STP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLOB)及 UA。

2.3 肝、肾指数测定

动物经完全采血死亡后,立即解剖取肝、肾,观察两者外观形态,电子天平精密称取湿重,计算肝、肾指数:动物脏器指数=脏器质量(mg)/体质量(g)。

2.4 肝、肾组织病理学形态变化观察

取各组裸鼠肝、肾组织经甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE 染色后,在生物显微镜下观察各组组织形态学变化。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组裸鼠血清中肝指标检测结果

与模型对照组相比,TRL-SMEDDS 组 AST、ALT、STP、白球比(A/G)无明显变化;TRL 原料药组 AST、ALT 显著升高($P < 0.05$ 或 < 0.01),STP 和 A/G 极显著下降($P < 0.01$)。与 TRL 原料药组相比,TRL-SMEDDS 组 AST 和 ALT 极显著下降($P < 0.01$),STP、A/G 显著升高($P < 0.05$ 或 < 0.01)。结果见表 1。

表 1 各组裸鼠血清 AST、ALT、STP 及 A/G 的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 1 The level of AST, ALT, STP and A/G in serum for each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	STP/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	白球比 A/G
模型对照组	108.40 ± 10.54	32.68 ± 4.38	51.84 ± 0.93	2.68 ± 0.22
TRL 原料药组	$127.74 \pm 8.53^{2)}$	$50.26 \pm 3.95^{1)}$	$45.46 \pm 1.85^{1)}$	$1.78 \pm 0.80^{1)}$
TRL-SMEDDS 组	$111.14 \pm 3.63^{3)}$	$34.90 \pm 2.12^{3)}$	$50.40 \pm 3.18^{4)}$	$2.74 \pm 0.16^{3)}$

注:与模型对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与 TRL 原料药组比较,³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

Note: compared with model control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; compared with TRL crude drug group, ³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$.

3.2 裸鼠肝组织病理学观察结果与肝指数

生物显微镜观察各组动物肝脏切片结果显示,模型对照组肝细胞索整齐清晰,细胞核呈圆形,以中央静脉为中心呈放射状排列,肝小叶结构完整,见图 1A;TRL-SMEDDS 组肝细胞有极轻微肿胀和空泡变性,少见炎细胞灶状浸润,见

图 1B; TRL 原料药组肝细胞失去原有小叶结构, 出现脂肪变性, 空泡化, 部分细胞核增大, 伴有碎片状坏死, 红细胞溢出, 中重度纤维化, 肝细胞之间炎性细胞增多, 见图 1C。

TRL 原料药组肝脏指数较模型对照组和 TRL-SMEDDS 组均无明显差异; TRL-SMEDDS 组与模型对照组相比无明显差异, 见表 2。

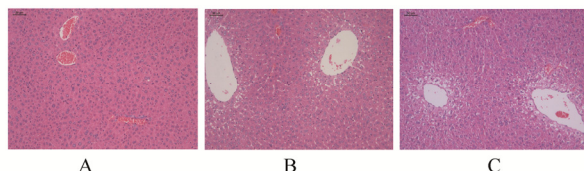


图 1 各组裸鼠肝组织 HE 染色病理学观察结果(200×)
A-模型对照组肝组织; B-TRL-SMEDDS 组肝组织; C-TRL 原料药组肝组织。
Fig. 1 Pathological observation of liver tissue of mice in each group (200×)
A-liver tissue of model control group; B-liver tissue of TRL-SMEDDS group; C-liver tissue of TRL crude drug group.

表 2 各组裸鼠肝、肾质量及肝、肾指数比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Tab. 2 Comparison of liver, kidney weight and liver kidney index of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	肝脏质量/g	肝脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	肾脏质量/g	肾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
模型对照组	1.00 ± 0.05	44.76 ± 1.33	0.29 ± 0.02	13.19 ± 1.04
TRL 原料药组	1.05 ± 0.05	45.01 ± 2.24	0.33 ± 0.03	14.12 ± 0.72
TRL-SMEDDS 组	0.99 ± 0.13	45.08 ± 1.82	0.30 ± 0.04	13.74 ± 0.88

3.3 各组裸鼠血清中肾脏指标检测结果

与模型对照组相比, TRL-SMEDDS 组裸鼠 Scr、Urea 和 UA 含量均无明显差异; TRL 原料药组 Scr 含量有上升趋势, 但无统计学意义, Urea 和 UA 含量均极显著升高($P < 0.01$)。与 TRL 原料药组相比, TRL-SMEDDS 组 Scr 含量有下降趋势, 但无统计学差异, Urea、UA 含量显著下降($P < 0.05$ 或 < 0.01)。结果见表 3。

表 3 各组裸鼠血清 Scr、Urea、UA 的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Tab. 3 The level of Scr, Urea and UA levels in mice serum for each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	Scr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Urea/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	UA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
模型对照组	6.40 ± 0.49	7.16 ± 0.70	157.50 ± 21.09
TRL 原料药组	6.80 ± 0.75	$8.64 \pm 0.70^{1)}$	$244.60 \pm 10.56^{1)}$
TRL-SMEDDS 组	6.60 ± 0.49	$7.58 \pm 0.43^{3)}$	$162.50 \pm 24.67^{2)}$

注: 与模型对照组相比, $^{1)}P < 0.01$; 与 TRL 原料药组相比, $^{2)}P < 0.01$, $^{4)}P < 0.05$ 。

Note: compared with model group, $^{1)}P < 0.01$; compared with TRL crude drug group, $^{3)}P < 0.01$, $^{4)}P < 0.05$ 。

3.4 裸鼠肾脏组织病理学观察结果与肾脏指数

生物显微镜观察各组动物肾脏切片显示, 模型对照组肾小管细胞排列整齐, 管腔清晰可见, 见图 2A; TRL-SMEDDS 组肾小管细胞与正常对照组相比无明显变化, 见图 2B; TRL 原料药组肾小管细胞与模型对照组相比无明显变化, 见图 2C。

与模型对照组相比, TRL-SMEDDS 组和 TRL 原料药组的肾脏指数均有上升趋势, 但均无统计学意义; 与 TRL-SMEDDS 组相比, TRL 原料药组肾脏指数有上升趋势, 但无统计学意义。结果见表 2。

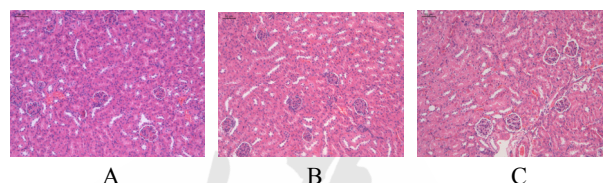


图 2 各组裸鼠肾脏组织 HE 染色病理学观察结果(200×)
A-模型对照组肾脏组织; B-TRL-SMEDDS 组肾脏组织; C-TRL 原料药组肾脏组织。
Fig. 2 Pathological observation of kidney tissue of mice in each group(200×)
A-kidney tissue of model control group; B-kidney tissue of TRL-SMEDDS group; C-kidney tissue of TRL crude drug group.

4 讨论

TRL 是中药雷公藤的主要活性成分, 具有免疫抑制、抗炎、抗病毒等作用。近年来研究发现 TRL 具有广泛的抗肿瘤作用, 但是临床使用雷公藤制剂时, 中毒患者体内常可以观察到肝、肾功能异常^[5-6]。SMEDDS 是由油相、表面活性剂和助表面活性剂(或助溶剂)形成的均一的热力学稳定分散系, 在体外轻微振荡或体内胃肠道的蠕动下, 可分散于水性介质中自发乳化形成微乳(粒径 $< 100 \text{ nm}$)^[7]。

本研究结果显示, TRL-SMEDDS 组的肝功能指标 ALT、AST、STP 和 A/G, 以及肾功能指标 Scr、Urea 和 UA 都明显比 TRL 原料药组接近于模型对照组。病理切片分析可见, TRL 原料药组动物肝脏细胞受损较严重, 显示出急性肝脏损害; 肾小管细胞无明显病变; TRL-SMEDDS 组动物肝脏细胞有轻微形态变化, 肾小管细胞正常。实验结果显示, TRL 原料药组裸鼠的生化指标提示 TRL 有肝脏和肾脏损害, 但病理切片分析发现肾脏并无实质性病变, 而肝脏已经发生了急性损害, 这可能与 TRL 的代谢途径相关, 具体原因待进一

步研究证实。

由此可见,TRL-SMEDDS对TRL的肝、肾毒性有一定抑制作用,特别是对肝脏细胞的毒性抑制,其中原因可能包括以下几个方面:①SMEDDS可使TRL易于透过肿瘤组织的血管在肿瘤组织蓄积,从而降低毒副作用^[8];②SMEDDS具有促淋巴系统转运的功能^[9],可减少TRL在体内的肝脏首过效应;③SMEDDS具有缓释性,使TRL在体内缓慢释放,有可能改变了其药动学特征,而使毒性降低,其药动学特征有待进一步研究。综上所述,利用自微乳对TRL进行包合,可以减轻药物对机体的毒副作用,对扩大雷公藤在临床上的应用有重要意义。

REFERENCES

- [1] XUE J, JIA X B, TAN X B, et al. Chemical constituents of *Tripterygium wilfordii* Hook. f and its toxicity [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2010, 25(5): 726-733.
- [2] 张喆, 张志勇. 雷公藤的毒理作用及增效减毒配伍的研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 705-707.
- [3] 骆永伟, 施畅, 原野, 等. 雷公藤甲素的毒理学研究进展[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(1): 74-77.
- [4] HINTZEN F, PERERA G, HAUPTSTEIN S, et al. *In vivo* evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system(SMEDDS) for leuporelin [J]. Int J Pharm, 2014, 472(1/2): 20-26.
- [5] LIU L, LI G, LI Q, et al. Triptolide induces apoptosis in human leukemia cells through caspase-3-mediated ROCK1 activation and MLC phosphorylation [J]. Cell Death Dis, 2013(4): e941.
- [6] WANG B, JIANG Z Z, ZHANG L Y. Advances in studies on toxicity and attenuation of triptolide [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2012, 35(3): 211-215.
- [7] PORTER C J H, POUTON C W, CUINE J F, et al. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(6): 673-691.
- [8] GREISH K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines [J]. Drug Target, 2007, 15(7/8): 457-464.
- [9] LIU C S, LONG X Y, CHEN L, et al. Study on self-microemulsifying drug delivery system in promoting lymphatic and hematological transport of puerarin in rats after oral administration [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2015, 26(6): 809-813.

收稿日期: 2018-06-13

(本文责编: 李艳芳)